

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**“ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL PARA EVALUAR EL
EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON HIDROXITIRO SOL Y
PUNICALAGINA SOBRE DIFERENTES MARCADORES TEMPRANOS
DE LA ATHEROSCLEROSIS EN SUJETOS DE MEDIANA EDAD,
APARENTEMENTE SANOS SIN ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR
ESTABLECIDA”**

Rebeca Quirós Fernández
Madrid, 2017

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**“ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL PARA EVALUAR EL
EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON HIDROXITIRO SOL Y
PUNICALAGINA SOBRE DIFERENTES MARCADORES TEMPRANOS
DE LA ATEROSCLEROSIS EN SUJETOS DE MEDIANA EDAD,
APARENTEMENTE SANOS SIN ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR
ESTABLECIDA”**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por: Rebeca Quirós Fernández,

Directoras: Carmen Gómez Candela y Bricia López Plaza

Unidad de Nutrición Clínica y Dietética

Hospital Universitario La Paz

Grupo de Investigación en Nutrición y Alimentos Funcionales (NUTRinvest)

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ)

El presente trabajo se ha realizado en la Unidad de Nutrición Clínica y Dietética del Hospital Universitario La Paz (HULP) por el Grupo de Investigación en Nutrición y Alimentos Funcionales (NUTRinvest) perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ).

El presente estudio ha sido apoyado por el proyecto HENUFOOD (CEN-20101016) del programa CENIT del Ministerio de Economía y Competitividad de España.

*“La felicidad se alcanza cuando lo que uno piensa,
lo que uno dice y lo que uno hace están en armonía”.*

Mahatma Gandhi (1869-1948)

Abogado, pensador y político indio.

Mi más sentido agradecimiento:

- A mis padres, por todo su amor incondicional y su grandísimo apoyo, sin el cual no habría sido posible esta aventura.
- A la Dra. Carmen Gómez Candela por acogerme dentro de su equipo de investigación y darme la oportunidad de llevar a cabo esta experiencia tan bonita y autosatisfactoria.
- A la Dra. Bricia López Plaza por ser una Directora de Tesis comprometida e inspiradora para mí, a la cual me une un gran cariño.
- A la Dra. Laura María Bermejo por ser una persona que, aparte de instruirme en el arte de la investigación, me hizo sentir como en casa.
- Al Dr. Carlos Iglesias Rosado por ser una persona encantadora y clave para la realización de este Proyecto al recomendarme para esta experiencia a la Dra. Gómez Candela.
- A mi prima Paloma, uno de los ángeles más bonitos que debe de haber en el cielo y nuestro ángel de la guarda.
- A mi Miguelito y a mi Bobby por ser mis grandes compañeros de camino en esta gran aventura que es la vida.
- Y a mi hermana y a todos mis grandes amigos (Noa, Jonathan, Luz, María José, Ana, Leo, José, Bárbara, etc.) por disfrutar conmigo de los momentos felices y ayudarme a luchar frente aquellos que no lo son tanto.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	21
ABSTRACT	25
SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	36
1.1. <i>ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....</i>	<i>36</i>
1.2. <i>ATEROSCLEROSIS.....</i>	<i>37</i>
1.3. <i>FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR DE LA ATEROSCLEROSIS</i>	<i>54</i>
1.4. <i>DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....</i>	<i>66</i>
1.5. <i>NIVELES CIRCULANTES ELEVADOS DE cLDLox.....</i>	<i>80</i>
1.6. <i>PREVENCIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS.....</i>	<i>88</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	98
2.1. <i>HIPÓTESIS.....</i>	<i>98</i>
2.2. <i>OBJETIVOS.....</i>	<i>98</i>
MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
3.1. <i>CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ESTUDIO</i>	<i>101</i>
3.2. <i>MÉTODO DE ALEATORIZACIÓN.....</i>	<i>102</i>
3.3. <i>TÉCNICAS DE ENMASCARAMIENTO Y CIEGO.....</i>	<i>102</i>
3.4. <i>SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....</i>	<i>102</i>
3.5. <i>SUJETOS DEL ESTUDIO.....</i>	<i>104</i>
3.6. <i>DISEÑO DEL ESTUDIO.....</i>	<i>105</i>
3.7. <i>DISTRIBUCIÓN DE LAS VISITAS DEL ESTUDIO.....</i>	<i>107</i>
3.8. <i>CÁPSULAS DE LOS TRATAMIENTOS (SAX Y PLACEBO)</i>	<i>112</i>
3.9. <i>EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO</i>	<i>113</i>
3.10. <i>TRATAMIENTOS CONCOMITANTES.....</i>	<i>114</i>
3.11. <i>EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS Y DE LA TOLERANCIA A LOS TRATAMIENTOS DEL ESTUDIO.....</i>	<i>114</i>
3.12. <i>EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA A LOS HÁBITOS DIETÉTICOS Y AL ESTILO DE VIDA.</i>	<i>118</i>

3.13.	MEDICIONES DE LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL	119
3.14.	MEDICIONES DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	122
3.15.	MEDICIONES DE LA FUNCIÓN VASCULAR.....	128
3.16.	ESTRATOS DE LA POBLACIÓN TOTAL SEGÚN DIVERSOS FRCV	130
3.17.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	130
RESULTADOS.....		133
DISCUSIÓN		170
5.1.	CARACTERÍSTICAS BASALES GENERALES, DIETÉTICAS, ANTROPOMÉTRICAS Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE LA POBLACIÓN	171
5.2.	CARACTERÍSTICAS BASALES DEL METABOLISMO GLUCÉMICO Y LIPÍDICO, DE SEGURIDAD, DE LA FUNCIÓN VASCULAR, Y DEL ESTADO OXIDATIVO E INFLAMATORIO DE LA POBLACIÓN	176
5.3.	EVALUACIÓN Y CONTROL DE DIFERENTES EFECTOS Y CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO CRUZADO.....	187
5.4.	CARACTERÍSTICAS DIETÉTICAS DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV	189
5.5.	CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV ..	198
5.6.	CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO GLUCÉMICO Y LIPÍDICO DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV.....	201
5.7.	CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV	215
5.8.	CARACTERÍSTICAS DE LA FUNCIÓN VASCULAR DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV	221
5.9.	CARACTERÍSTICAS DEL ESTADO OXIDATIVO DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV	238
5.10.	CARACTERÍSTICAS DEL ESTADO INFLAMATORIO DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV.....	253
CONCLUSIONES.....		272
REFERENCIAS.....		276

<i>ANEXOS</i>	<i>333</i>
----------------------------	-------------------

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1. Placa de ateroma.....</i>	<i>38</i>
<i>Ilustración 2. Estructura de una arteria.....</i>	<i>40</i>
<i>Ilustración 3. Expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular.....</i>	<i>45</i>
<i>Ilustración 4. La fijación al endotelio vascular de los monocitos, su trasmigración a la capa íntima, y su conversión a macrófagos y a células espumosas en el interior de la pared arterial.</i>	<i>46</i>
<i>Ilustración 5. Formación de la estría grasa durante el proceso aterosclerótico.....</i>	<i>47</i>
<i>Ilustración 6. Progresión de la lesión aterosclerótica (CML: Células del Músculo Liso).</i>	<i>48</i>
<i>Ilustración 7. Formación de la placa de ateroma.....</i>	<i>49</i>
<i>Ilustración 8. Inicio, progresión, desestabilización y complicaciones de la Aterosclerosis.....</i>	<i>50</i>
<i>Ilustración 9. Corte transversal de placa de ateroma propensa a la ruptura.....</i>	<i>51</i>
<i>Ilustración 10. Fases asintomáticas y sintomáticas de la Aterosclerosis.</i>	<i>52</i>
<i>Ilustración 11. Algunas manifestaciones de la trombosis oclusiva.</i>	<i>53</i>
<i>Ilustración 12. Promoción de la disfunción endotelial por diversos FRCV.....</i>	<i>67</i>
<i>Ilustración 13. Disfunción endotelial involucrada en la iniciación, progresión y complicaciones de la Aterosclerosis.</i>	<i>68</i>
<i>Ilustración 14. Factores que regulan el tono vascular producido por el endotelio.</i>	<i>70</i>
<i>Ilustración 15. Evaluación de la función endotelial mediante la vasodilatación mediada por flujo (DMF) de una arteria.</i>	<i>75</i>
<i>Ilustración 16. Estrés oxidativo y diversas ECV.....</i>	<i>81</i>
<i>Ilustración 17. Hipótesis de la Aterosclerosis "Modificación Oxidativa".</i>	<i>82</i>

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Composición de las cápsulas (SAX y Placebo).....</i>	<i>113</i>
<i>Cuadro 2. Criterios SEEDO para definir la obesidad según el índice de masa corporal (IMC) en adultos.</i>	<i>173</i>
<i>Cuadro 3. Valores de obesidad central según la CCi en función del país/etnia específica.</i>	<i>174</i>
<i>Cuadro 4. Clasificación ponderal en función del porcentaje de grasa corporal.....</i>	<i>176</i>
<i>Cuadro 5. Medias de la glucemia basal y de las diversas variables del metabolismo lipídico de la población del presente estudio vs. valores de referencia para la población estudiada.....</i>	<i>177</i>
<i>Cuadro 6. Medias de las variables de seguridad de la población del estudio vs. valores de normalidad para la población estudiada.....</i>	<i>178</i>
<i>Cuadro 7. Medias de la presión arterial de la población del estudio vs. valores óptimos según los criterios de ESH/ESC, SEH/LELHA y JNC7-8.....</i>	<i>179</i>
<i>Cuadro 8. Clasificación y manejo de la presión arterial en adultos según los criterios del JNC7.</i>	<i>180</i>
<i>Cuadro 9. Distribución de los sujetos con preHTA y normotensión arterial entre los grupos del estudio.....</i>	<i>180</i>
<i>Cuadro 10. Medias de la PCR-us y el fibrinógeno de la población del estudio vs. rangos de normalidad para la población estudiada.....</i>	<i>186</i>
<i>Cuadro 11. Objetivos nutricionales establecidos por la OMS/FAO (2003)</i>	<i>190</i>
<i>Cuadro 12. Cálculo del RCV de la población del presente estudio de padecer un evento CV en 10 años mediante la evaluación de FRCV tradicionales.....</i>	<i>232</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Diagrama de flujo que describe el ensayo clínico.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 2. Resumen de distribución de los tratamientos según la secuencia asignada.</i>	<i>106</i>
<i>Figura 3. Resumen de las principales visitas durante el estudio.</i>	<i>107</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Características basales generales de la población.....</i>	<i>133</i>
<i>Tabla 2. Características basales dietéticas de la población.....</i>	<i>134</i>
<i>Tabla 3. Características basales antropométricas y de la composición corporal de la población.</i>	<i>135</i>
<i>Tabla 4. Características basales metabólicas, de seguridad y de la función vascular de la población.</i>	<i>136</i>
<i>Tabla 5. Características basales del estado oxidativo e inflamatorio de la población.</i>	<i>137</i>
<i>Tabla 6. Características generales de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.....</i>	<i>138</i>
<i>Tabla 7. Características dietéticas de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.....</i>	<i>139</i>
<i>Tabla 8. Características antropométricas y de la composición corporal de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.....</i>	<i>140</i>
<i>Tabla 9. Características metabólicas, de seguridad y de la función vascular de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabla 10. Características del estado oxidativo e inflamatorio de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.</i>	<i>142</i>
<i>Tabla 11. Perfil calórico de la población en función del tratamiento asignado.</i>	<i>143</i>
<i>Tabla 12. Perfil lipídico y otras características dietéticas de la población en función del tratamiento asignado.....</i>	<i>144</i>
<i>Tabla 13. Perfil calórico de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.</i>	<i>145</i>
<i>Tabla 14. Perfil lipídico y otras características dietéticas de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.</i>	<i>146</i>
<i>Tabla 15. Perfil calórico de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.</i>	<i>147</i>
<i>Tabla 16. Perfil lipídico y otras características dietéticas de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.....</i>	<i>148</i>
<i>Tabla 17. Variables antropométricas y de composición corporal de la población en función del tratamiento asignado.....</i>	<i>149</i>
<i>Tabla 18. Variables antropométricas y de composición corporal de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.</i>	<i>150</i>

<i>Tabla 19. Variables antropométricas y de composición corporal de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.....</i>	<i>151</i>
<i>Tabla 20. Variables metabólicas de la población en función del tratamiento asignado.</i>	<i>152</i>
<i>Tabla 21. Variables metabólicas de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.....</i>	<i>153</i>
<i>Tabla 22. Variables metabólicas de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.....</i>	<i>154</i>
<i>Tabla 23. Variables de seguridad de la población en función del tratamiento asignado.....</i>	<i>155</i>
<i>Tabla 24. Variables de seguridad de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.....</i>	<i>156</i>
<i>Tabla 25. Variables de seguridad de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos del cLDLox.</i>	<i>157</i>
<i>Tabla 26. Variables de la función vascular de la población en función del tratamiento asignado.....</i>	<i>158</i>
<i>Tabla 27. Variables de la función vascular de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.....</i>	<i>159</i>
<i>Tabla 28. Variables de la función vascular de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.</i>	<i>160</i>
<i>Tabla 29. Variables del estado oxidativo de la población en función del tratamiento asignado.</i>	<i>161</i>
<i>Tabla 30. Variables del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.....</i>	<i>162</i>
<i>Tabla 31. Variables del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.</i>	<i>163</i>
<i>Tabla 32. Variables del estado inflamatorio de la población en función del tratamiento asignado.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabla 33. Variables del estado inflamatorio de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabla 34. Variables del estado inflamatorio de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.</i>	<i>166</i>
<i>Tabla 35. Variables de la función vascular y del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de los valores de PAS.</i>	<i>167</i>

<i>Tabla 36. Variables de la función vascular y del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de los valores de PAD.</i>	<i>168</i>
---	------------

ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1. Perfil calórico de la población del estudio en las diversas intervenciones vs. recomendaciones establecidas por la OMS/FAO (2003) y por la SENC (2011).....</i>	<i>192</i>
<i>Gráfica 2. Correlación inversamente proporcional entre los cambios observados en el porcentaje energético aportado por el alcohol a la dieta total y la función endotelial.....</i>	<i>195</i>
<i>Gráfica 3. Perfil lipídico de la población del estudio en función del tratamiento vs. recomendaciones establecidas por la OMS/FAO (2003) y por la SENC (2011).....</i>	<i>196</i>
<i>Gráfica 4. Inicio y fin de la PAS y PAD en los sujetos con preHTA sistólica o HTA sin tratamiento farmacológico en las diversas intervenciones.....</i>	<i>225</i>
<i>Gráfica 5. Inicio y fin de la PAS y PAD en los sujetos con preHTA diastólica o HTA sin tratamiento farmacológico en las diversas intervenciones.....</i>	<i>225</i>
<i>Gráfica 6. Diferencias en la PAS en los sujetos con preHTA sistólica o diastólica o HTA entre las diversas intervenciones.....</i>	<i>226</i>
<i>Gráfica 7. Inicio y fin de la función endotelial evaluada por la DMF en la población total en función del tratamiento.....</i>	<i>231</i>
<i>Gráfica 8. Inicio y fin de la función endotelial evaluada por la DMF en los sujetos con DE tras las diversas intervenciones.....</i>	<i>233</i>
<i>Gráfica 9. Diferencias en la función endotelial evaluada por la DMF en los sujetos con DE entre las diversas intervenciones.....</i>	<i>234</i>
<i>Gráfica 10. Correlación inversamente proporcional entre los niveles circulantes de cLDLox y la función endotelial en los sujetos con elevados niveles circulantes de cLDLox.....</i>	<i>235</i>
<i>Gráfica 11. Correlación inversamente proporcional entre los niveles circulantes de cLDLox y la función endotelial en los sujetos con elevados niveles circulantes de cLDLox y DE.....</i>	<i>235</i>
<i>Gráfica 12. Inicio, fin y diferencias de los niveles circulantes de cLDLox en la población total en función del tratamiento.....</i>	<i>244</i>
<i>Gráfica 13. Inicio, fin y diferencias de los niveles circulantes de cLDLox en los sujetos con elevados niveles circulantes de cLDLox en función del tratamiento.....</i>	<i>245</i>
<i>Gráfica 14. Diferencias en los niveles circulantes de cLDLox en los sujetos con DE entre las diversas intervenciones.....</i>	<i>249</i>
<i>Gráfica 15. . Inicio y fin de la función endotelial en los sujetos con niveles circulantes normales de cLDLox en función del tratamiento.....</i>	<i>250</i>

<i>Gráfica 16. Inicio y fin de los niveles circulantes de 8-iso-PGF_{2α} en los sujetos con preHTA sistólica o HTA en función del tratamiento.</i>	<i>251</i>
<i>Gráfica 17. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y de PCR-us en la población total al inicio del estudio.</i>	<i>259</i>
<i>Gráfica 18. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y de IL-6 en la población total al inicio del estudio.</i>	<i>260</i>
<i>Gráfica 19. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y el porcentaje de leucocitos séricos en la población total al inicio del estudio.</i>	<i>260</i>
<i>Gráfica 20. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y los valores de PAS en la población total al inicio del estudio.</i>	<i>261</i>
<i>Gráfica 21. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y los valores de PAD en la población total al inicio del estudio.</i>	<i>261</i>
<i>Gráfica 22. Correlación directamente proporcional entre los niveles circulantes de.....</i>	<i>264</i>
<i>Gráfica 23. Correlación directamente proporcional entre los niveles circulantes de.....</i>	<i>264</i>

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La Aterosclerosis es la principal causa de Enfermedad Cardiovascular (ECV) y de mortalidad en todo el mundo. Por esta razón, es considerada como una importante epidemia de salud pública internacional. La Aterosclerosis es una enfermedad crónica de lenta progresión, que se desarrolla de forma silenciosa a lo largo de los años en las paredes de las arterias de mediano y/o gran calibre. Cuando se manifiestan los síntomas, generalmente a mediana edad, el proceso aterosclerótico suele estar en una fase avanzada. En esta etapa pueden darse lugar eventos cardiovasculares (CV) agudos que se producen de forma repentina y conducen, frecuentemente, a la muerte antes de que se pueda dispensar la atención médica necesaria. En los últimos años, el conocimiento de la patogenia de la Aterosclerosis ha aumentado, especialmente en lo que se refiere al rol que ejercen sobre ella factores de riesgo cardiovascular (FRCV) emergentes como la disfunción endotelial (DE) y los niveles circulantes elevados de la lipoproteína de baja densidad oxidada (cLDLox). Estos FRCV emergentes son claves en todo el proceso aterosclerótico, desde el desarrollo hasta la progresión y las complicaciones de la Aterosclerosis. Además, han demostrado ser predictores de ECV aterosclerótica y de futuros eventos CV, incluso entre sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos. Asimismo, hay que destacar cómo el tratamiento de estos FRCV emergentes ha contribuido de forma importante a prevenir la progresión y las complicaciones de la Aterosclerosis. En este sentido, destaca el papel de polifenoles como el hidroxitirosol (HT) y la punicalagina (PC), los cuales han demostrado tener efectos cardioprotectores y antiateroscleróticos al mejorar la función endotelial y proteger frente a la oxidación de las cLDL, entre otros efectos. Todo esto hace que surja la necesidad de emplear nuevos marcadores que ayuden al reconocimiento, la evaluación y la gestión de la Aterosclerosis, para así ayudar a reducir la carga de morbimortalidad CV.

HIPÓTESIS: La suplementación oral con HT y PC mejora marcadores tempranos de la Aterosclerosis en sujetos de mediana edad, aparentemente sanos sin ECV establecida.

OBJETIVO PRINCIPAL: Evaluar el efecto de la suplementación oral con HT y PC (SAX) sobre marcadores tempranos de la Aterosclerosis en población adulta de mediana edad, aparentemente sana sin ECV establecida. En concreto, sobre FRCV emergentes como la DE y los niveles circulantes elevados de cLDLox.

OBJETIVOS SECUNDARIOS: Evaluar el efecto de la suplementación oral con HT y PC (SAX) sobre diversas variables evaluadoras de la función vascular, el estado oxidativo e inflamatorio, del metabolismo glucémico y lipídico, etc. relacionadas con la Aterosclerosis.

DISEÑO Y METODOLOGÍA: El estudio es un ensayo clínico cruzado, controlado, aleatorizado y doble ciego con un periodo de duración de 20 semanas y un tamaño muestral de 84 sujetos (17 hombres, 67 mujeres de entre 45-65 años). Los sujetos seleccionados fueron aparentemente sanos sin diagnóstico y/o tratamiento para diversos FRCV tradicionales [Hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus, dislipemias, obesidad, etc.] y sin ECV establecida. El estudio estuvo constituido por dos secuencias de tratamiento (Secuencia Placebo/SAX, n=41: mujeres=33, hombres=8) y (Secuencia SAX/Placebo, n=43: mujeres=34, hombres=9), cuyos periodos de intervención (Placebo y SAX) tuvieron una duración de 8 semanas cada uno de ellos. Entre ambos intervalos hubo un periodo de lavado de 4 semanas. El suplemento estuvo compuesto por 9,9 mg de HT y 195 mg de PC, y el placebo por maltrodextrina. Durante los periodos de intervención los sujetos consumieron 3 cápsulas/día (con las principales comidas) del suplemento o del placebo, dependiendo del periodo de intervención en el que se encontraran en cada momento. Al inicio y final de cada periodo de intervención se realizó la evaluación de las diversas variables evaluadoras de la función vascular (PAS, PAD, FC y DMF), del estado oxidativo [cLDLox, 8-iso-PGF_{2α}, TBARS, FRAP, PON-1 y NO(x)], del estado inflamatorio (PCR-us, fibrinógeno, IL-6 y sVCAM-1), del perfil glucémico y lipídico (glucosa basal, colesterol total, cLDL, cHDL y triglicéridos), etc. La evaluación de las diversas variables se realizó tanto en la población total como en los grupos de riesgo que presentaban FRCV emergentes como la DE (DMF<10%) y los niveles circulantes elevados de cLDLox (>P₇₅). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS® 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Todas las pruebas estadísticas se consideraron bilaterales y como valores significativos aquellos con una p inferior a 0,05.

RESULTADOS PRINCIPALES: El 80% de los sujetos que iniciaron el ensayo clínico (n=67) finalizaron el estudio [(Secuencia Placebo/SAX, n=33 sujetos: mujeres=26, hombres=7) y (Secuencia SAX/Placebo, n=34 sujetos: mujeres=27, hombres=7)]. Tras 8 semanas de intervención el consumo del suplemento con HT y PC produjo una mejora significativa tanto de la función endotelial (de 8,04 [IC_{95%} 7,04-9,03] a 9,46 [IC_{95%} 8,48-10,45] %; p<0,05) como de los niveles circulantes de cLDLox (de 108,9 [IC_{95%} 77,37-140,4] a 97,44 [IC_{95%} 67,05-127,8] ng/mL; p<0,05). Sin embargo, esta mejora no se observó tras el periodo de intervención con placebo ni en la función endotelial (de 8,08 [IC_{95%} 7,22-8,93] a 8,62 [IC_{95%}

7,60-9,64] %; $p=NS$) ni en los niveles circulantes de cLDLox (de 98,86 [IC_{95%} 66,87-130,8] a 105,9 [IC_{95%} 70,96-140,9] ng/mL; $p=NS$). A este respecto, cabe señalar que tras el periodo de intervención con el suplemento los sujetos redujeron significativamente los niveles circulantes de cLDLox comparado con placebo (SAX: -11,44 vs. Placebo: 7,05 ng/mL; $p<0,05$). En lo referente a los sujetos que presentaban los FRCV emergentes, se observó cómo tras el consumo de suplemento los sujetos que padecían de DE (70,2%) mejoraron significativamente su función endotelial (de 6,57 [IC_{95%} 5,67-7,48] a 8,93 [IC_{95%} 7,75-10,12] %; $p<0,001$). Esta mejora en la DE fue estadísticamente superior comparada con placebo (SAX: 2,36 vs. Placebo: 0,76 %; $p<0,01$). Asimismo, los sujetos con niveles circulantes elevados de cLDLox redujeron de forma significativa los niveles de cLDLox tras el consumo de suplemento (de 258,2 [IC_{95%} 197,8-318,6] a 229,5 [IC_{95%} 164,1-294,9] ng/mL; $p<0,05$). Este descenso fue significativamente superior comparado con placebo (SAX: -28,74 vs. Placebo: 25,64 ng/mL; $p<0,001$). Unido a todo esto, se produjo un efecto hipotensor tras el periodo de intervención con el suplemento en los sujetos que presentaban prehipertensión arterial (preHTA) o HTA no diagnosticada y sin tratamiento farmacológico. En este sentido, los sujetos que presentaron preHTA sistólica o HTA disminuyeron significativamente tras el consumo del suplemento tanto los valores de la PAS (de 123,9 [IC_{95%} 121,3-126,6] a 108,2 [IC_{95%} 101,3-115,1] mmHg; $p<0,001$) como de la PAD (de 82,37 [IC_{95%} 79,65-85,09] a 78,19 [IC_{95%} 74,62-81,75] mmHg; $p<0,05$). Obteniéndose en estos sujetos diferencias significativas entre ambos periodos de intervención en los valores de la PAS al finalizar el estudio (SAX: -15,75 vs. Placebo: -2,67 mmHg; $p<0,05$). Lo mismo ocurrió en los sujetos que presentaron preHTA diastólica o HTA, los cuales vieron disminuidos tras el periodo de intervención con el suplemento sus valores tanto de la PAS (de 121,8 [IC_{95%} 115,8-127,8] a 106,2 [IC_{95%} 96,50-115,9] mmHg; $p<0,01$) como de la PAD (de 84,42 [IC_{95%} 81,87- 86,96] a 78,04 [IC_{95%} 73,80-82,28] mmHg; $p<0,001$). En estos sujetos también se observaron diferencias significativas entre ambos periodos de intervención en los valores de PAS al final del estudio (SAX: -15,60 vs. Placebo: -2,66 mmHg; $p<0,05$). Cabe destacar que los sujetos con preHTA o HTA tras el consumo del suplemento presentaron cifras de normotensión arterial. En el presente estudio no se observaron efectos/eventos adversos o signos/síntomas de baja tolerancia tras el consumo del suplemento. La adherencia en ambas intervenciones fue alta (>90%).

CONCLUSIONES: El consumo durante 8 semanas de un suplemento oral con HT y PC mejora marcadores tempranos de la Aterosclerosis en sujetos de mediana edad, aparentemente sanos sin ECV establecida. Asimismo, el suplemento con HT y PC presenta efectos antiateroscleróticos al mejorar la función endotelial, la presión arterial y los niveles

circulantes de cLDLox, especialmente en aquellas personas que presentaban estos parámetros alterados. En consecuencia, el consumo de polifenoles como el HT y PC podría contribuir en la prevención primaria de la Aterosclerosis, al disminuir el RCV aterosclerótico que presentan estos sujetos.

PALABRAS CLAVES: Aterosclerosis, disfunción endotelial, lipoproteína de baja densidad oxidada, hidroxitirosol, punicalagina.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Atherosclerosis is the main cause of Cardiovascular diseases (CVD) and mortality in the world. For this reason is considered as an important international public health epidemic. Atherosclerosis is a chronic disease of slow progression that it evolves in a silent way along the years in the walls of the medium and/or big size arteries. When the symptoms appears, usually into middle-age, the Atherosclerotic process is often in an advance stage. In this stage may occur acute CV events that are produced suddenly and lead, frequently, to death before any health care can be given. In the last years, knowledge in the pathogenesis of Atherosclerosis has increased, specially about the important role that have emerging Cardiovascular Risk Factors (CVRF), as endothelial dysfunction (ED) and high levels of circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) play on it. These emerging CVRF are key in the whole Atherosclerotic process, from development until progression and complications of Atherosclerosis. Furthermore it has been showed to be predictors of Atherosclerotic CVD and future CV events, even among asymptomatic of CVD or apparently healthy subjects. There is also to highlight how the treatment of these emerging CVRF have contributed to prevent in an important way the progression and complications of Atherosclerosis. In this context roles of polyphenols as Hydroxytyrosol (HT) and Punicalagin (PC) stand out, which have shown to have cardioprotector and antiatherosclerotic effects by improving endothelial function and protect against LDL oxidation, among other effects. All this create need to use new markers that help with recognition, evaluation and management of Atherosclerosis, and so to help to reduce CV morbidity and mortality.

HYPOTHESIS: Oral supplementation with HT and PC improve early atherosclerosis markers on middle aged subjects apparently healthy with no established CVD.

MAIN GOAL: Evaluate the effect of oral supplementation with HT and PC (SAX) on early atherosclerosis markers involve in Atherosclerosis asymptomatic phase on middle aged adult population apparently healthy with no established CVD. Specially on emerging CVRF as ED and high levels of circulating oxLDL.

SECONDARY GOALS: Evaluate the effect of oral supplementation with HT and PC (SAX) in various variables evaluating vascular function, oxidation and inflammatory state, glycemic and lipid profile, etc. related with Atherosclerosis.

DESIGN AND METHODOLOGY: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover trial with a 20 weeks time duration and carried out in 84 subjects (17 males and 67 females between 45-65 years). Subjects were apparently healthy with no diagnoses and/or treatment for diverse traditional CVRF [High blood pressure (HBP), diabetes mellitus, dyslipidemias, obesity, etc.] and with no established CVD. Study was composed by two treatment sequences (Placebo/SAX, n=41: female=33, male=8) and (SAX/Placebo, n=43: female=34, male=9), which intervention periods (Placebo and SAX) were 8 weeks long each of them. Between both of them there were 4 weeks wash out period. Supplement was composed by 9.9 mg HT and 195 mg PC and placebo by maltodextrine. During intervention periods subjects intake 3 capsules per day (along with main meals) of supplement or placebo depending on the intervention period they were in the moment. At beginning and end of each intervention period an evaluation of diverse variables evaluating vascular function (ASP, ADP, HR and FMD), oxidative state [oxLDL, 8-iso-PGF_{2α}, TBARS, FRAP, PON-1 and NO(x)], inflammatory state (hs-CRP, fibrinogen, IL-6 and sVCAM-1), glucemic and lipidic profile (basal glucose, total cholesterol, LDL, HDL and triglycerides) were taken in total population as well as in risk groups that showing emerging CVRF as ED (FMD<10%) and high levels of circulating oxLDL (>P₇₅). Data was analyze with Statistical Software SAS® 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) (significant: p<0.05).

MAIN RESULTS: 67 subjects finished the study [(Placebo/SAX, n=33 subjects: female=26, male=7) and (SAX/Placebo, n=34 subjects: female=27, male=7)]. The supplement intake with HT and PC after 8 weeks of intervention produced in the total population a significative improvement in the endothelial function (from 8.04 [CI_{95%} 7.04-9.03] to 9.46 [CI_{95%} 8.48-10.45] %; p<0,05) and in the levels of circulating oxLDL (from 108.9 [CI_{95%} 77.37-140.4] to 97.44 [CI_{95%} 67.05-127.8] ng/mL; p<0.05). This improvement was not observed after the intervention period with Placebo, neither in the endothelial function (from 8.08 [CI_{95%} 7.22-8.93] to 8.62 [CI_{95%} 7.60-9.64] %; p=NS) nor in the levels of circulating oxLDL (from 98.86 [CI_{95%} 66.87-130.8] to 105.9 [CI_{95%} 70.96-140.9] ng/mL; p=NS). In addition, there were significative differences in the observed changes in the levels of circulating oxLDL between both intervention periods at the end of the study (SAX: -11.44 vs. Placebo: 7.05 ng/mL; p<0,05). This improvement in the endothelial function after supplement consume was produced in those subjects that showed ED (70.2%) (from 6.57 [CI_{95%} 5.67-7.48] to 8.93 [CI_{95%} 7.75-10.12] %; p<0.001). In these subjects with ED existed significative differences in the endothelial function between both intervention periods at the end of the study (SAX: 2.36 vs. Placebo: 0.76 %; p<0.01). Moreover, the improvement

in the oxLDL circulating levels after the supplement consume was more pronounced in the subjects that showed higher oxLDL levels (from 258.2 [CI_{95%} 197.8-318.6] to 229.5 [CI_{95%} 164.1-294.9] ng/mL; $p<0.05$). In these subjects with upper oxLDL circulating levels there were significative differences in the oxLDL levels between both intervention periods at the end of the study (SAX: -28.74 vs. Placebo: 25.64 ng/mL; $p<0.001$). Furthermore, after the intervention period with the supplement was observed a hipotensor effect in the subject presenting prehypertension (preHBP) or HBP non diagnosed and with no pharmacological treatment. In these sense, in subjects presenting systolic preHBP or HBP were produced a significative decrease of ASP (from 123.9 [CI_{95%} 121.3-126.6] to 108.2 [CI_{95%} 101.3-115.1] mmHg; $p<0.001$) as well as ADP (from 82.37 [CI_{95%} 79.65-85.09] to 78.19 [CI_{95%} 74.62-81.75] mmHg; $p<0.05$) after the consumption of the supplement. It was observed significative differences between both intervention periods in these subjects with systolic preHBP or HBP in the values of ASP at the end of the study (SAX: -15.75 vs. Placebo: -2.67 mmHg; $p<0.05$). Same happened in subjects showing diastolic preHBP or HBP that reduced their ASP values (from 121,8 [CI_{95%} 115.8-127.8] to 106.2 [CI_{95%} 96.50-115.9] mmHg; $p<0.01$) as well as their ADP values (from 84.42 [CI_{95%} 81.87- 86.96] to 78.04 [CI_{95%} 73.80-82.28] mmHg; $p<0.001$). Significative differences occurred in subjects with diastolic preHBP or HBP between both intervention periods in ASP values at the end of the study (SAX: -15.60 vs. Placebo: -2.66 mmHg; $p<0.05$). It is noteworthy that subjects with preHBP or HBP after the intervention period with the supplement showed arterial normotension data. In this study was not observed adverse events/effects or signs/symptoms of low tolerance after the supplement consumption. Adherence in both intervention periods was high (>90%).

CONCLUSION: Supplementation with HT and PC for 8 weeks improve early atherosclerosis markers in middle aged subjects apparently healthy with no established CVD. In this way, the supplement showed antiatherosclerotic effects by improving the endothelial function, blood pressure and levels of circulating oxLDL, specially in those persons that have these parameters altered. So polyphenols consumption like HT and PC could contribute in the Atherosclerosis primary prevention reducing the Atherosclerotic cardiovascular risk that showed these subjects.

KEYWORD: Atherosclerosis, endothelial dysfunction, oxidised low density lipoprotein cholesterol, Hydroxytyrosol, Punicalagin.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

LISTADO DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

Resumen de las abreviaturas, siglas y acrónimos más utilizados (por orden alfabético):

°C: grado centígrado.	ALT: Alanina aminotransferasa.
μA: microamperio.	ANG I: Angiotensina I, <i>siglas en inglés</i> .
μg: microgramo.	ANG II: Angiotensina II, <i>siglas en inglés</i> .
μL: microlitro.	ANIBES: Antropometría, Ingesta y Balance Energético en España.
μM: micromolar.	Apo: Apolipoproteína.
μMeq.MDA: micromolar equivalente de malondialdehído.	Aprox.: Aproximadamente.
μMeq.T: micromolar equivalente de Trolox.	ARG I: Arginasa I.
3T3-L1: Línea celular de preadipocitos.	AST: Aspartato aminotransferasa.
8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano.	AUC: Área bajo la curva, <i>siglas en inglés</i> .
ACC: Colegio Americano de Cardiología, <i>siglas en inglés</i> .	AUCt0: Área bajo la curva del diámetro arterial en reposo.
ACV: Accidente cerebrovascular.	AUCtd: Área bajo la curva del diámetro arterial postisquemia.
ACVA: Accidente cerebrovascular agudo.	BIA: impedancia bioeléctrica, <i>siglas en inglés</i> .
ADA: Asociación Americana de Diabetes, <i>siglas en inglés</i> .	CA: California.
ADMA: Dimetilarginina asimétrica, <i>siglas en inglés</i> .	Caco-2: Colorrectal epitelial de adenocarcinoma humano heterogéneo, <i>siglas en inglés</i> .
AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.	CAT: Catalasa.
AGES: Productos finales de glicación avanzada.	CCAA: Comunidades autónomas.
AGM: Ácidos grasos monoinsaturados.	CCi: Circunferencia de cintura.
AGP: Ácidos grasos poliinsaturados.	CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, <i>siglas en inglés</i> .
AGS: Ácidos grasos saturados.	CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica.
AHA: Asociación Americana del Corazón, <i>siglas en inglés</i> .	CEs: Células endoteliales.
AIT: Accidente isquémico transitorio.	chDL: Colesterol unido a lipoproteína de alta densidad.
ALA: Ácido alfa linolénico, <i>siglas en inglés</i> .	

cLDL: Colesterol unido a lipoproteína de baja densidad.

cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada.

cm: centímetro.

Cmax: Concentración máxima.

CMLVs: Células del músculo liso vascular.

COX: Ciclooxygenasa.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CPEs: Células progenitoras endoteliales.

CRD: Cuaderno de recogida de datos.

CV: Cardiovascular.

d: día.

DARIOS: Dislipemia, Riesgo de Aterosclerosis y aumento de la PCR-us y estado inflamatorio y oxidativo en la población española, *siglas en inglés*.

DE: Disfunción endotelial.

DGAT1: Diacilglicerol O-aciltransferasa 1.

DHA: Ácido docosahexaenoico, *siglas en inglés*.

dL: decilitros.

DL50: Dosis letal, 50%.

DM: Diabetes mellitus.

DMF: Dilatación mediada por flujo.

Dña: Doña.

EA: Ácido elágico, *siglas en inglés*.

ECV: Enfermedad/es cardiovascular/es.

EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio, *siglas en inglés*.

EE.UU.: Estados Unidos de América.

EFG: ElectroFluidGraph analyzer.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, *siglas en inglés*.

EGCG: Epigallocatequina-3-galato.

Ej.: Ejemplo.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, *siglas en inglés*.

EMA: Agencia Europea del Medicamento, *siglas en inglés*.

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial, *siglas en inglés*.

EO: Estrés oxidativo.

EPA: Ácido eicosapentaenoico, *siglas en inglés*.

EPG: Factor de crecimiento epidérmico, *siglas en inglés*.

EPIC: Investigación Prospectiva Europea sobre el Cáncer y la Nutrición, *siglas en inglés*.

ERCs: Especies reactivas de cloro.

ERNs: Especies reactivas de nitrógeno.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

ESC: Sociedad Europea de Cardiología, *siglas en inglés*.

ESH: Sociedad Europea de Hipertensión, *siglas en inglés*.

ET-1: Endotelina 1.

Etc.: Etcétera.

EUROLIVE: Efecto del Consumo de aceite de Oliva en el daño Oxidativo en las poblaciones Europeas, *siglas en inglés*.

FA: Fosfatasa Alcalina.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, *siglas en inglés*.

FAS: Ácido graso sintasa, *siglas en inglés*.

FC: Frecuencia cardiaca.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América, *siglas en inglés*.

Fe²⁺: Ion ferroso.

Fe³⁺: Ion férrico.

FeCl₃: Tricloruro de hierro.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico, *siglas en inglés*.

FRAP: Capacidad de reducción férrica del plasma, *siglas en inglés*.

FRCV: Factor/es de riesgo cardiovascular.

FVOO: Aceite de oliva virgen funcional, *siglas en inglés*.

g: gramos.

GE: Gasto energético.

GRAS: Generalmente reconocida como segura, *siglas en inglés*.

h: horas.

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

H₃PW₁₂O₄₀: Ácido fosfotúngstico.

HbA1c: hemoglobina A1c o hemoglobina glicosilada.

HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa.

HR: Hazard ratio.

HT: Hidroxitirosol.

HTA: Hipertensión arterial.

HULP: Hospital Universitario La Paz.

IAM: Infarto agudo de miocardio.

IC: Intervalo de confianza.

IC_{95%}: Intervalo de confianza del 95%.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1, *siglas en inglés*.

ICC: Insuficiencia cardíaca crónica.

IDF: Federación Internacional de la Diabetes, *siglas en inglés*.

IdiPAZ: Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz.

IE: Ingesta energética.

IFN-γ: Interferón gamma.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1, *siglas en inglés*.

IgG: Inmunoglobulina G.

IHR: Índice de hiperemia reactiva.

IL-1: Interleucina 1.

IL-1β: Interleucina 1 beta.

IL-6: Interleucina 6.

IL-6R: Receptor de la interleucina 6, *siglas en inglés*.

IL-8: Interleucina 8.

IL-10: Interleucina 10.

IL-12: Interleucina 12.

IMC: Índice de masa corporal.

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible, *siglas en inglés*.

IR: Ingesta recomendada.

ISH: Sociedad Internacional de Hipertensión, *siglas en inglés*.

JNC 7: Séptimo Informe del Comité Nacional de los Estados Unidos de América sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial, *siglas en inglés*.

JNC 8: Octavo Informe del Comité Nacional de los Estados Unidos de América sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial, *siglas en inglés*.

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal, *siglas en inglés*.

JNK 2: Quinasa c-Jun N-terminal 2, *siglas en inglés*.

kcal: kilocalorías.

kg: kilogramos.

kHz: kilohercio.

L: Litro.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LELHA: Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial.

LH: Lipasa hepática.

LOX-1: Receptor de lectina tipo 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, *siglas en inglés*.

Lp-PLA2: Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína, *siglas en inglés*.

LPL: Lipasa de lipoproteínas, *siglas en inglés*.

lpm: latidos por minuto.

m²: metros cuadrados.

MA: Massachusetts.

MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1, *siglas en inglés*.

MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos, *siglas en inglés*.

MDA: Malondialdehído.

mg: miligramos.

MG: Masa grasa.

MHz: Megahercio.

MI: Michigan.

min: minuto.

mL: mililitro.

MLG: Masa libre de grasa.

MM: Masa muscular.

mmHg: milímetro de mercurio.

mmol: milimoles.

MMPs: Metaloproteinasas de matriz, *siglas en inglés*.

MMP 1: Metaloproteinasa de matriz 1, *siglas en inglés*.

MMP 9: Metaloproteinasa de matriz 9, *siglas en inglés*.

MPO: Mieloperoxidasa.

n: tamaño muestral.

NaCl: Cloruro de sodio.

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato, *siglas en inglés*.

NADPH oxidase: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidasa, *siglas en inglés*.

NC: Carolina del Norte, *siglas en inglés*.

NCEP-ATP III: III Panel de Tratamiento en Adultos del Programa Nacional de Estados Unidos de América de Educación sobre el Colesterol, *siglas en inglés*.

ng: nanogramos.

nm: nanómetro.

NO: Óxido nítrico, *siglas en inglés*.

NO₂⁻: Nitritos.

NO₃⁻: Nitratos.

NO(x): Nitratos y nitritos.

NOAEL: Nivel sin observarse efecto adverso, *siglas en inglés*.

NS: No significativo.

NUTRinvest: Grupo de Investigación en Nutrición y Alimentos Funcionales del Hospital Universitario La Paz.

O₂⁻: Superóxido.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OO: Aceite de oliva, *siglas en inglés*.

OR: Odds ratio.

ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, *siglas en inglés*.

p: valor de significación.

P₇₅: Percentil 75.

PAD: Presión arterial diastólica.

PAF: Factor activador de plaquetas, *siglas en inglés*.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1, *siglas en inglés*.

PAS: Presión arterial sistólica.

PC: Punicalagina.

PCR: Proteína C reactiva.

PCR-us: Proteína C reactiva ultrasensible.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, *siglas en inglés*.

pg: picogramos.

PGE₂: Prostaglandina E₂, *siglas en inglés*.

PGH₂: Prostaglandina H₂, *siglas en inglés*.

PGI₂: Prostaciclina, *siglas en inglés*.

PKB: Proteína quinasa B, *siglas en inglés*.

PKC: Proteína quinasa C, *siglas en inglés*.

PON-1: Paraoxonasa 1.

PPAR- α : Receptor de peroxisoma-proliferador-activado alfa, *siglas en inglés*.

PPAR- γ : Receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma, *siglas en inglés*.

ppm: partes por millón.

PREDIMED: Prevención Primaria de la Enfermedad Cardiovascular con la Dieta Mediterránea.

PreHTA: Prehipertensión arterial.

PTGS₂: Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2, *siglas en inglés*.

r: relación.

RAW 264,7: Línea celular macrófago murino.

RCV: Riesgo cardiovascular.

REGICOR: Registro de Girona del Corazón, *siglas en catalán*.

REML: Método de estimación por máxima verosimilitud restringida, *siglas en inglés*.

RL: Radical libre.

RM: Resonancia magnética.

RR: Riesgo relativo.

SAS: Software de Análisis Estadístico, *siglas en inglés*.

SAX: Suplemento antioxidante rico en hidroxitirosol y punicalagina.

SCORE: Evaluación Sistemática del Riesgo Coronario, *siglas en inglés*.

SDH: Sorbitol dehidrogenasa, *siglas en inglés*.

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad.

SEH: Sociedad Española de Hipertensión.

SENC: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria.

Sida: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

sIL-6R: Receptor soluble de la interleucina 6, *siglas en inglés*.

SOD: Superóxido dismutasa.

SREBP-1c: Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1c, *siglas en inglés*.

sVCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1 soluble, *siglas en inglés*.

t0: diámetro arterial en reposo.

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, *siglas en inglés*.

TC: Tomografía computarizada.

td: diámetro arterial postisquemia.

TG: Triglicéridos.

thODE: Ácido hidroxiocetadecadienoico total, *siglas en inglés*.

TMB: tetrametilbenzidina.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, *siglas en inglés*.

TnT: Troponina T.

t-PA: Activador tisular del plasminógeno, *siglas en inglés*.

TPTZ: 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina.

tx: tratamiento.

TXA2: tromboxano A2, *siglas en inglés*.

U: Unidad/es.

UBE: Unidad de bebida estándar.

UCICEC: Unidad Clínica de Investigación y Ensayos Clínicos.

UI: Unidad internacional.

USA: Estados Unidos de América, *siglas en inglés*.

vs.: versus.

V0: Visita 0.

V1: Visita 1.

V2: Visita 2.

V3: Visita 3.

V4: Visita 4.

V5: Visita 5.

V6: Visita 6.

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1, *siglas en inglés*.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, *siglas en inglés*.

VOO: Aceite de oliva virgen, *siglas en inglés*.

ω -3: Ácido graso poliinsaturado omega 3.

ω -6: Ácido graso poliinsaturado omega 6.

WHO: Organización Mundial de la Salud, *siglas en inglés*.

x: por (símbolo de multiplicación).

SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA

SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

1.1.1. DEFINICIÓN, TIPOS Y ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) constituyen un conjunto de entidades que hacen referencia a trastornos acontecidos en el corazón y en los vasos sanguíneos. Las ECV se clasifican en: enfermedades coronarias o cardiopatías coronarias, enfermedades cerebrovasculares, hipertensión arterial (HTA), enfermedades vasculares periféricas, insuficiencias cardíacas, cardiopatías reumáticas, cardiopatías congénitas y miocardiopatías (WHO 2011a).

La Aterosclerosis es la principal causa de ECV (Lönn et al. 2012). Las ECV debidas a la Aterosclerosis son las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares isquémicas, y las patologías de la aorta y de otras arterias (entre las que se incluyen la HTA y las enfermedades vasculares periféricas) (Cannon 2013; WHO 2011b).

Entre los principales factores de riesgo cardiovascular (FRCV) que contribuyen al desarrollo de las ECV, se encuentran aquellos debidos a un inadecuado estilo de vida (hábito tabáquico, falta de actividad física, alimentación poco saludable y consumo de alcohol inadecuado). Estos FRCV son modificables y evitarlos contribuye de manera importante a disminuir la morbimortalidad CV (Cannon 2013; WHO 2011c; WHO 2011b).

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las ECV son la principal causa de muerte a nivel mundial. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que murieron por esta causa 17,5 millones de personas en todo el mundo, lo que representa el 31% del total de las muertes registradas (WHO 2015b; WHO 2014). Esta cifra lejos de disminuir sigue aumentando, observándose un incremento del 12,5% desde el 2005 hasta el 2015. En este sentido, en el año 2015 se registraron 17,9 millones de muertes por ECV, lo cual supone un ratio de mortalidad de 285,5 por cada 100.000 habitantes (GBD Mortality and Causes of Death Collaborators 2016).

En las próximas décadas se estima que estas cifras seguirán aumentando debido a la adopción, cada vez más global, de estilos de vida poco saludables (Cannon 2013; WHO 2011c; WHO 2011b). Según esta predicción se calcula que en el año 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por ECV, previéndose que seguirá siendo la principal causa de muerte a nivel mundial (Cannon 2013).

En Europa, las ECV también son la primera causa de muerte. Estas patologías provocan cada año más de 4 millones de defunciones, lo cual representan el 45% de la mortalidad total registrada en esta región (WHO 2017a; Townsend et al. 2016; Townsend et al. 2015). Las ECV causan casi 2 veces más muertes que el cáncer en todo el continente (Townsend et al. 2015) y 46 veces el número de muertes causadas por la combinación de enfermedades como el sida, la tuberculosis y la malaria en toda Europa (WHO 2017a). En España, las ECV también son la principal causa de mortalidad con una tasa de 252,7 muertos por cada 100.000 habitantes (INE 2016).

1.2. ATEROSCLEROSIS

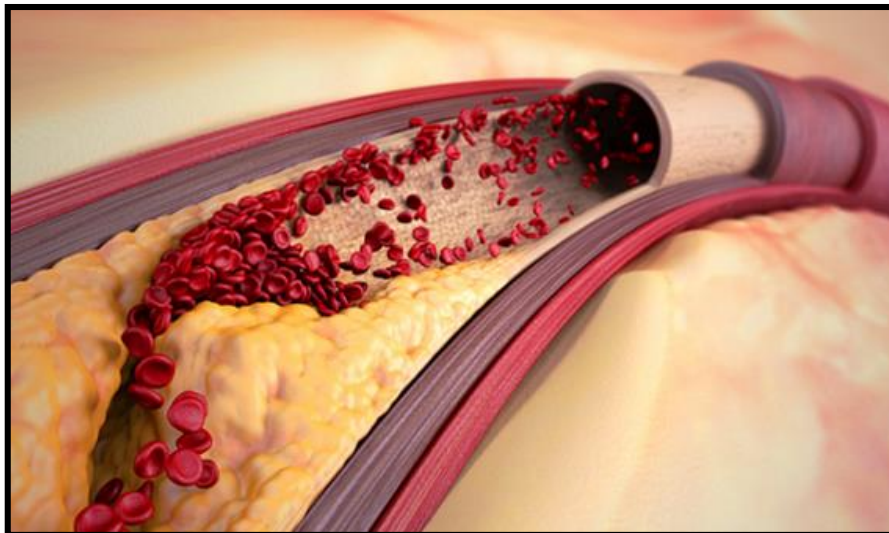
1.2.1. DEFINICIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS

La Aterosclerosis es una enfermedad crónica de lenta progresión, y de etiología múltiple y compleja (Cahill & Redmond 2016; Lönn et al. 2012; Libby 2012; Libby 2002; WHO 2011b; Inoue & Node 2006). La Aterosclerosis se desarrolla de forma silenciosa a lo largo de los años en las paredes de las arterias de mediano y gran calibre (WHO 2011b). El proceso aterosclerótico suele comenzar en la infancia con la formación de la estría grasa. Continúa en la adolescencia, donde las lesiones aumentan y se forman las primeras placas fibrosas (Bertomeu Ruiz & Zambón Rados 2002). Y cuando se manifiestan los síntomas, generalmente a mediana edad, el proceso aterosclerótico suele estar en una fase avanzada. En esta etapa pueden darse lugar eventos CV agudos que se producen de forma repentina y conducen, frecuentemente, a la muerte antes de que se pueda dispensar la atención médica necesaria (WHO 2011b).

En la Aterosclerosis se produce un engrosamiento y endurecimiento de las arterias de mediano y/o gran calibre por la formación de placas de ateroma. La Aterosclerosis ocurre por la respuesta de la pared del vaso sanguíneo a una lesión crónica multifactorial provocada por diversos factores de riesgo ateroscleróticos (diabetes, dislipemias, hábito tabáquico, sedentarismo, alimentación poco saludable, consumo nocivo de alcohol, HTA,

predisposición genéticas de riesgo, edad avanzada, etc.), que conduce a la formación de las placas (WHO 2011b; Inoue & Node 2006). Estas placas ateroscleróticas se forman en el interior de la arterias y están compuestas principalmente de una mezcla de tejido fibroso, células y lípidos (Lönn et al. 2012; Inoue & Node 2006). Las placas ateroscleróticas provocan que la superficie interna de los vasos sanguíneos se vuelva irregular, además de ocasionar la pérdida de elasticidad y el engrosamiento de la pared arterial (WHO 2011b). Esto disminuye el espacio luminal de la arteria y dificulta el tránsito del flujo sanguíneo (**Ilustración 1**) (WHO 2011b). Este hecho puede causar manifestaciones clínicas (Lahoz & Mostaza 2007) y dar lugar a eventos CV agudos, entre los que se encuentra los ataques cardíacos y el ictus o infarto cerebral (WHO 2011b).

Ilustración 1. Placa de ateroma.



Las regiones vasculares más propensas a desarrollar lesión ateroscleróticas son las que presentan un flujo discontinuo o turbulento que promueve el desarrollo y la progresión de la Aterosclerosis. Estas regiones, donde se presentan patrones de flujo alterados, están cerca de puntos de ramificación, bifurcaciones y mayores curvas geometrías arteriales. Por el contrario, las porciones tubulares no ramificadas de las arterias que presentan un flujo uniforme están relativamente protegidas de la aterogénesis (Gimbrone et al. 2000).

1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

La Aterosclerosis es la principal causa de ECV (Lönn et al. 2012) y de mortalidad en todo el mundo (Barquera et al. 2015), y se estima que lo seguirá siendo en el año 2020 (Scott 2002).

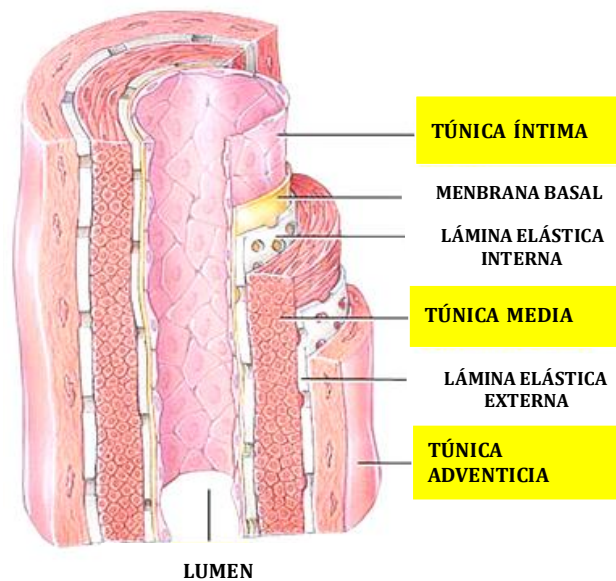
Por esta razón, es considerada como una importante epidemia de salud pública internacional (Barquera et al. 2015).

Las ECV debidas a la Aterosclerosis, como se ha mencionado en apartados previos, son las cardiopatías coronarias isquémicas, la mayoría de las enfermedades cerebrovasculares, y las patologías de la aorta y de otras arterias (entre las que se incluyen la HTA y las enfermedades vasculares periféricas) (Cannon 2013; WHO 2011b). La cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular son la primera y la tercera causa de muerte, respectivamente (Barquera et al. 2015). Estas enfermedades causaron en el año 2015 un total de 15,2 millones de muertes (243,1 muertos por 100.000 habitantes), lo que representa el 85,2% de la mortalidad CV registrada en ese año (GBD Mortality and Causes of Death Collaborators 2016). En este sentido, hay que destacar que la cardiopatía isquémica es, desde hace años, la primera causa de muerte a nivel mundial (Barquera et al. 2015; GBD Mortality and Causes of Death Collaborators 2016; GBD Mortality and Causes of Death Collaborators 2015).

Por todo esto, medidas preventivas que ayuden a mantener la salud arterial son claves para ayudar a reducir la morbilidad CV (WHO 2011b).

1.2.3. HISTOFISIOLOGÍA DE LA ARTERIA SANA

La pared vascular de la arteria sana, desde el punto de vista microscópico, está constituida principalmente por elastina, colágeno y músculo liso. Mientras que desde el punto de vista macroscópico, la pared vascular está compuesta por tres capas o tunicas concéntricas estructurales básicas claramente diferenciadas, que desde la luz vascular hacia fuera son: la túnica o capa íntima, la túnica o capa media y la túnica o capa adventicia (**Ilustración 2**).

Ilustración 2. Estructura de una arteria.

- La *túnica o capa íntima* es la capa que está en contacto con la sangre y donde principalmente se desarrolla el proceso aterosclerótico (Harvard Medical School 2005). Esta capa está formada por:
 - Endotelio: integrado por una monocapa de células endoteliales (CEs) que delimitan el lumen del vaso sanguíneo. Las CEs se encuentran estrechamente unidas unas a otras actuando como una barrera selectivamente permeable entre los compartimentos extravascular e intravascular (Cahill & Redmond 2016). Existen diferentes mecanismos por los que las macromoléculas cruzan la barrera endotelial. Algunos de estos mecanismos son la difusión lateral en la membrana celular endotelial, a través de las uniones celulares endoteliales, mediante transporte vesicular, etc. La mayoría de las moléculas biológicas son aniónicas, grandes e hidrofílicas, por lo que son incapaces de difundirse a través de la bicapa de la membrana de las CEs. Por este motivo, la mayoría se mueven a través de las uniones intercelulares de las CEs o a través del complejo sistema de microvesículas presente en estas células (Cahill & Redmond 2016). Por otra parte, las CEs producen diversos factores que actúan sobre ellas y sobre otras células, como las células sanguíneas y las células del músculo liso vascular (CMLVs) adyacentes. De esta manera, regulan el flujo sanguíneo local, la angiogénesis y la

hemostasis (Levick 2003). El endotelio descansa sobre una lámina basal constituida principalmente por tejido conectivo.

- Subendotelio: constituido por tejido conjuntivo laxo. En esta parte de la capa íntima se localizan fibras colágenas, fibroblastos, CMLVs y elementos del sistema de macrófagos. Estos últimos actúan renovando los elementos caducos de esta capa interna. Debajo de la capa subendotelial se encuentra la lámina elástica interna.

Es importante señalar que a medida que aumenta la edad, la *capa íntima* presenta un mayor número de CMLVs (Arellano 2013).

- La *túnica o capa media* es la más gruesa de la pared del vaso sanguíneo y es la principal responsable de la fuerza ejercida por la pared arterial (Harvard Medical School 2005). Esta capa está formada por:
 - Fibras musculares lisas: que contienen CMLVs y están dispuestas en láminas concéntricas helicoidales.
 - Tejido conjuntivo: donde predominan las fibras elásticas y existen algunas fibras colágenas y glucosaminoglucanos.

En el caso de las arterias musculares existe una lámina elástica externa que separa la capa media de la capa adventicia.

La estructura molecular de la elastina de la capa media permite a las arterias expandirse durante la sístole y encogerse durante la diástole, amortiguando los cambios en el flujo sanguíneo debidos al comportamiento pulsátil de la bomba cardiaca. Esta propiedad es fundamental en el caso de arterias elásticas como la aorta, en las que las CMLVs de la túnica media están organizadas en múltiples capas concéntricas separadas por distintas láminas de elastina. El grosor relativo de la túnica media aumenta gradualmente desde la arteria aorta hasta las arteriolas, que poseen una estructura predominantemente muscular.

- La *túnica o capa adventicia* es una capa de tejido conjuntivo fibroelástico denso, sin distinción con el borde exterior continuando con el tejido conectivo circundante. Esta capa está compuesta principalmente por colágeno y fibroblastos. En ella

también se pueden observar algunas fibras elásticas, vasos sanguíneos (*vasa vasorum*) en las grandes arterias, vasos linfáticos y nervios. Los elementos fibrilares en esta capa están embebidos en una matriz de sustancia amorfa (glucosaminoglucanos), cuya función consiste en mantener unido el vaso sanguíneo al tejido circundante.

El colágeno está presente en las tres capas de la pared vascular y actúa como un almacén de anclaje para las CMLVs. A medida que la presión intraluminal aumenta, el entramado de fibras de colágeno se va haciendo más rígido, limitando la distensibilidad vascular. Los principales elementos en la fisiología de la pared vascular son las CEs y las CMLVs (Arellano 2013).

Es importante destacar que la estructura histológica varía dependiendo de la función que deba desarrollar cada segmento arterial. En este sentido, hay distintos tipos de arterias según su función: arterias elásticas y arterias musculares.

- Las *arterias elásticas o de gran calibre* (ej. arteria aorta) son las que reciben y conducen la sangre a altas presiones. Estas arterias poseen una pared vascular muy distensible debido a que su túnica media es rica en elastina (Levick 2003). En las arterias elásticas el músculo liso está distribuido en capas concéntricas formando las unidades lamelares, separadas por láminas fenestradas de elastina y por tejido conectivo orientado radialmente. Puede haber hasta 70 de estas unidades lamelares en la capa media de una arteria de gran espesor, como es la aorta. La elastina proporciona a estas arterias la capacidad de expandirse hasta un 10% durante cada latido del corazón, permitiendo dar cabida a toda la sangre propulsada. La capa adventicia en estas arterias es delgada con respecto a su espesor total y presenta una gran proporción de fibras de colágeno, las cuales previenen la sobreextensión del tejido elástico.
- Las *arterias musculares o de mediano o pequeño calibre* (son la mayoría de las arterias, ej. arterias coronarias) tienen un mayor contenido en músculo liso que las arterias elásticas y a diferencia de éstas, distribuyen y regulan la cantidad de sangre que llega a una determinada zona del organismo. La presión sanguínea media varía muy poco a lo largo de las arterias elásticas, debido a que su lumen ofrece poca resistencia al flujo sanguíneo. Los mayores cambios en la presión se producen en arterias pequeñas, ya que su resistencia al flujo es mucho mayor. En

alusión a este hecho, estas arterias de pequeño calibre se denominan arterias de resistencia. Estas arterias pueden incrementar o reducir el flujo sanguíneo en función de la demanda local. Así, cuando el vaso de resistencia se dilata, la resistencia baja y el flujo local aumenta. Por el contrario, la vasoconstricción de estas arterias aumenta la resistencia local y disminuye el flujo sanguíneo en el tejido (Levick 2003).

1.2.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

La Aterosclerosis, como se ha mencionado anteriormente, es una enfermedad crónica de lenta progresión, y de etiología múltiple y compleja (Cahill & Redmond 2016; Lönn et al. 2012; Libby 2012; Libby 2002; WHO 2011b; Inoue & Node 2006). Durante el proceso aterosclerótico ocurren diversos estados fisiopatológicos, entre los que se encuentran la disfunción endotelial (DE), el estrés oxidativo (EO) y el ambiente proinflamatorio a nivel vascular (Inoue & Node 2006).

Dada la complejidad que rodea al proceso ateroscleroso, es difícil identificar el suceso aterogénico clave que desencadena su desarrollo (Cahill & Redmond 2016; Lönn et al. 2012; Libby 2012; Libby 2002). Por esta razón, se han creado diversas hipótesis sobre cuál es el evento fisiopatológico que inicia y protagoniza dicho proceso. Algunos autores proponen como responsable la presencia de DE en la arteria (Hirase & Node 2012; Inoue & Node 2006), mientras que otros señalan como tal al EO encabezado por la lipoproteínas de baja densidad oxidadas (cLDLox) (Stocker & Keaney 2004; Steinberg et al. 1989). Lo que está claro es que estos procesos fisiopatológicos caminan juntos a lo largo de todo el proceso aterosclerótico.

Tanto en los estadios iniciales como en la progresión de la Aterosclerosis, la presencia de DE cobra especial relevancia. Esto es debido a que el endotelio, en este estado, pierde su habilidad para mantener la homeostasis vascular al ver mermada su capacidad para regular la permeabilidad de la pared vascular, el tono del vaso sanguíneo, la adhesión y la trans migración de células inflamatorias a la íntima, la agregación plaquetaria al endotelio, el balance hemostático/fibrinolítico, la proliferación y migración de las CMLVs a la íntima, y la angiogénesis del vaso sanguíneo (Cahill & Redmond 2016; Deanfield et al. 2007; Kinlay et al. 2001).

Por consiguiente, la presencia de DE trae consigo importantes consecuencias que alteran la histofisiología normal del vaso sanguíneo. Entre estas consecuencias se encuentra una reactividad vascular alterada (Gimbrone et al. 2000), un aumento en la permeabilidad del endotelio a macromoléculas (Inoue & Node 2006), y un incremento en la adhesión y trans migración de leucocitos a la capa íntima arterial. Otros factores que contribuyen a la modificación de la histofisiología vascular son una mayor adhesión plaquetaria al endotelio, una alteración en la regulación del crecimiento y la supervivencia de diversas células vasculares, así como una alteración en el balance hemostático/fibrinolítico que favorece la trombogénesis (Inoue & Node 2006; Gimbrone et al. 2000).

A todo esto hay que añadir que la presencia de DE promueve la acumulación de cLDLox en la capa íntima arterial. Este hecho constituye otro de los primeros y críticos eventos acontecidos en la Aterosclerosis.

La acumulación de cLDLox en la pared arterial es además favorecida por la existencia de lipoproteínas de baja densidad (cLDL) pequeñas y densas tanto en el torrente circulatorio como en el espacio subendotelial. La capacidad aterogénica de las cLDL pequeñas y densas radica en su hipersusceptibilidad a ser oxidadas por la acción de los radicales libres (RL) y dar lugar a las cLDLox (Chait et al. 1993). A esta capacidad también contribuye el hecho de que presenten una distribución espacial diferente a las cLDL nativas, lo que impide su normal reconocimiento por los receptores de cLDL celulares apoB-100/apoE. Esto hace que permanezcan más tiempo en la circulación sanguínea y aumente su probabilidad de ingresar al interior de la pared vascular. Además, al ser más pequeñas estas partículas, pueden atravesar cómodamente el endotelio, introducirse en la capa íntima y transformarse en cLDLox en el interior del vaso sanguíneo.

La oxidación de las cLDL produce cambios importantes en su estructura, provocando que las cLDL oxidadas (cLDLox) dejen de ser reconocidas por los receptores celulares de las cLDL nativas y pasen a ser captadas por un tipo de receptores denominados *scavenger*. Estos receptores *scavenger* están en diversas células, entre las que se encuentran las CEs. Uno de los principales receptores de superficie existente en las CEs capaz de unirse a las cLDLox, es el receptor de lectina tipo 1 de cLDLox (LOX-1, *siglas en inglés*). La expresión de este receptor está regulada por los propios niveles de cLDLox a través de un mecanismo de regulación positiva. Este receptor juega un importante papel en la promoción de la DE (Chen et al. 2002; Li & Mehta 2000; Kume et al. 1998). Esto es debido a que las cLDLox cuando se

unen a sus receptores en las CE activan a estas células, siendo su activación un paso previo a la DE.

Una vez que el endotelio está activado, expresa moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, *siglas en inglés*) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, *siglas en inglés*). Estas moléculas juegan un papel fundamental en la interacción entre el endotelio vascular y los leucocitos (**Ilustración 3**) (Nakashima et al. 1998). La expresión de estas moléculas en el endotelio también es estimulada por la presencia de citoquinas proinflamatorias a nivel vascular, tales como la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , *siglas en inglés*) y la proteína C reactiva de fase aguda (PCR); siendo esta última producida en el hígado en respuesta a la presencia de interleucina 6 (IL-6) (Verma et al. 2002; Collins & Cybulsky 2001).

Ilustración 3. Expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular.

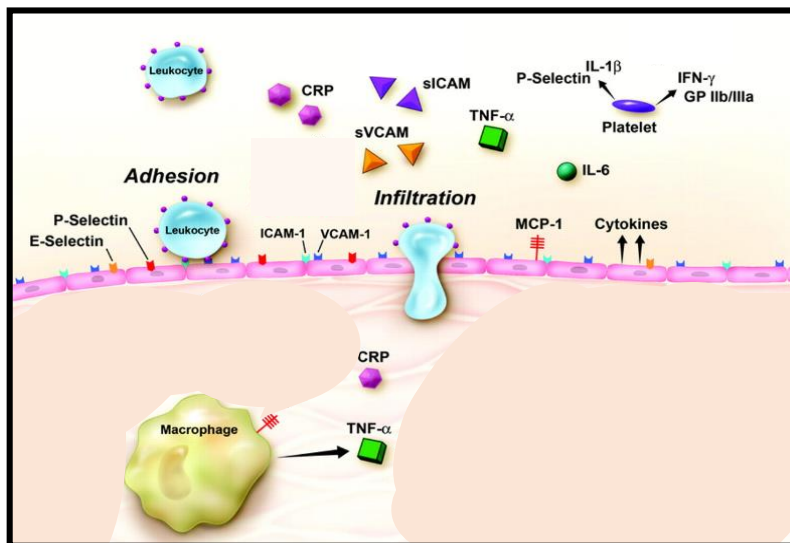


Imagen modificada de Napoli C. et al., 2006.

Estas moléculas de adhesión favorecen la fijación de diversos leucocitos a la pared arterial, entre los que se encuentran los monocitos. Una vez fijados los monocitos al endotelio, lo atraviesan y se dirigen hacia el espacio subendotelial, donde es estimulada su proliferación y diferenciación a macrófagos por el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF, *siglas en inglés*) (Hamilton et al. 1999; Kamanna et al. 1999; Kaplan & Aviram 1999) y por las propias cLDLox (Cahill & Redmond 2016; Maiolino et al. 2013; Yui et al. 1993).

Las cLDLox también favorecen la transformación de los macrófagos a células espumosas (Pirillo et al. 2013; Aviram 1996). Esto es debido a que los macrófagos presentan receptores *scavenger* que pueden captar a las cLDLox y a diferencia de lo que ocurre con los receptores de las cLDL nativas, la captación de las cLDLox no está limitada. Es decir, la síntesis de los receptores *scavenger* en los macrófagos no depende del contenido intracelular de esta lipoproteína. De esta manera, los macrófagos pueden incorporar grandes cantidades de cLDLox y transformarse en células espumosas (Martínez-González et al. 2001) (**Ilustración 4**).

Ilustración 4. La fijación al endotelio vascular de los monocitos, su trasmigración a la capa íntima, y su conversión a macrófagos y a células espumosas en el interior de la pared arterial.

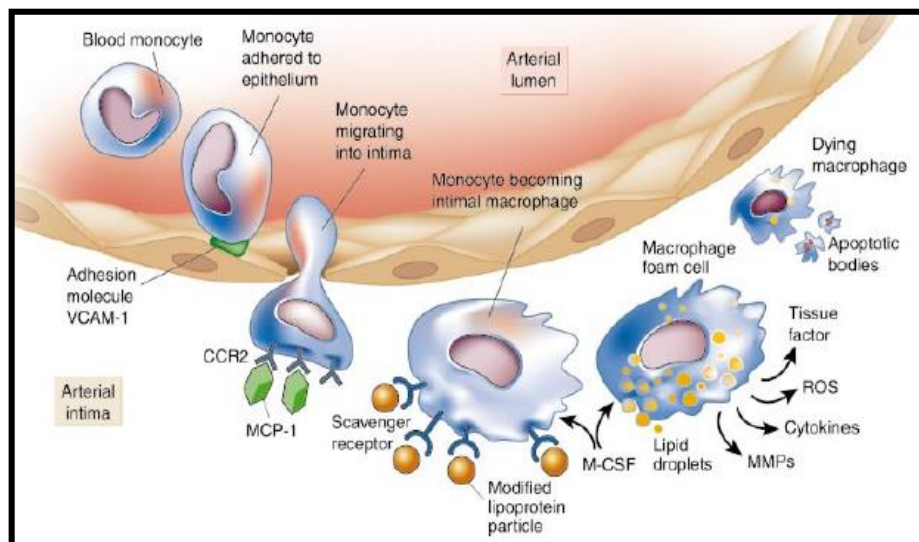


Imagen extraída de Libby P. et al., 2010.

La acumulación de células espumosas y de lípidos en la pared arterial da lugar a la formación de la “estría grasa” (**Ilustración 5**), en la cual se irá formando un “núcleo necrótico” a medida que las células espumosas y otras células vayan muriendo (Libby 2012; Ball et al. 1995). La “estría grasa” es una lesión asintomática y reversible, que constituyen un paso previo a la formación de la placa de ateroma.

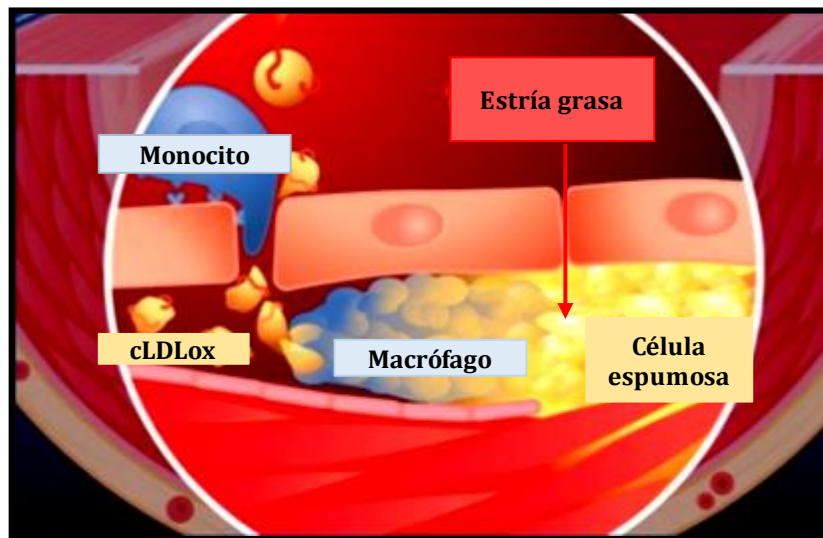
Ilustración 5. Formación de la estría grasa durante el proceso aterosclerótico.

Imagen modificada de la Federación Argentina de Cardiología, 2009.

Por otra parte, la expresión en el endotelio de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1 y E-selectina, también permite la fijación de los linfocitos T a la pared vascular y facilita su trans migración a la capa íntima. Estas células inflamatorias en el ambiente subendotelial producen diversas citoquinas como MCSF, TNF- α y fundamentalmente interferón γ (IFN- γ), que desempeñan importantes funciones en el proceso aterosclerótico (Yokota & Hansson 1995).

Posteriormente, en la progresión de la lesión aterosclerótica se produce la proliferación y la migración de las CMLVs desde la capa media arterial hasta la íntima. Estas células están reguladas por un complejo sistema de citoquinas producidas por ellas mismas (regulación autocrina) y por diferentes tipos celulares (regulación paracrina), además de por la presencia de las cLDLox (Z. Li et al. 1998).

En la regulación paracrina participan los macrófagos a través de la síntesis de la interleucina 1 (IL-1) (interviene en la activación de las CMLVs), del factor de crecimiento fibroblástico (FGF, *siglas en inglés*) (induce a la división celular y a la síntesis proteica a las CMLVs), así como a través de la síntesis del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *siglas en inglés*) y del factor de crecimiento epidérmico (EPG, *siglas en inglés*) (que juegan un papel importante en la proliferación y migración de las CMLVs hacia la íntima).

En esta regulación paracrina participan también los linfocitos T y las plaquetas. Los linfocitos T intervienen al inducir la expresión de receptores para PDGF en las CMLVs mediante la acción del IFN- γ , además de estimular a los macrófagos a producir IL-1 y PDGF. Por otra parte, las plaquetas participan como importantes productores de PDGF al fijarse al endotelio vascular en presencia de DE o de lesión del mismo.

En la regulación autocrina, las propias CMLVs producen diversas citoquinas como el FGF, la IL-1, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *siglas en inglés*), el TNF- α , etc., que estimulan su proliferación y migración hacia la íntima arterial (Stein & Stein 1995; Reidy & Bowyer 1993).

La lesión aterosclerótica continua cuando los macrófagos que están presentes en la lesión ateromatosa segregan diversas enzimas hidrolíticas (colagenasas, gelatinasas, elastasas, etc.) que remodelan la matriz extracelular. Al producirse esta degradación de la matriz extracelular, las CMLVs inician su diferenciación hacia un estado activado, transformándose de un fenotipo contráctil a fenotipo sintético (Newby & Zaltsman 1999; Campbell & Campbell 1994). Este cambio de fenotipo trae consigo una síntesis elevada de colágeno de tipo 1, elastina y proteoglicanos, que da lugar a la formación de una gran cantidad de matriz extracelular (**Ilustración 6**).

Ilustración 6. Progresión de la lesión aterosclerótica (CML: Células del Músculo Liso).

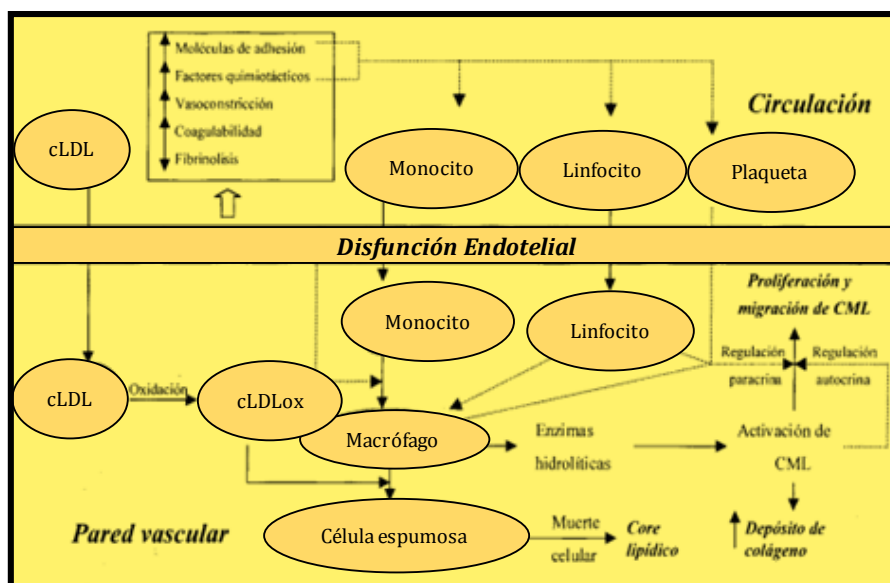


Imagen modificada de Espondaburu O. et al., 2004.

La proliferación y el cambio de fenotipo de las CMLVs y su consecuente producción de matriz extracelular, contribuyen a la formación de una cápsula fibrosa que recubre la “estría grasa” y el “núcleo necrótico” (Miana et al. 2012). Este hecho da lugar a la formación de la placa de ateroma (**Ilustración 7**). Además, las CMLVs presentan receptores *scavenger* en su membrana en respuesta al TNF- α y al IFN- γ , pudiéndose así transformar en células espumosas (Campbell & Campbell 1994).

Ilustración 7. Formación de la placa de ateroma.

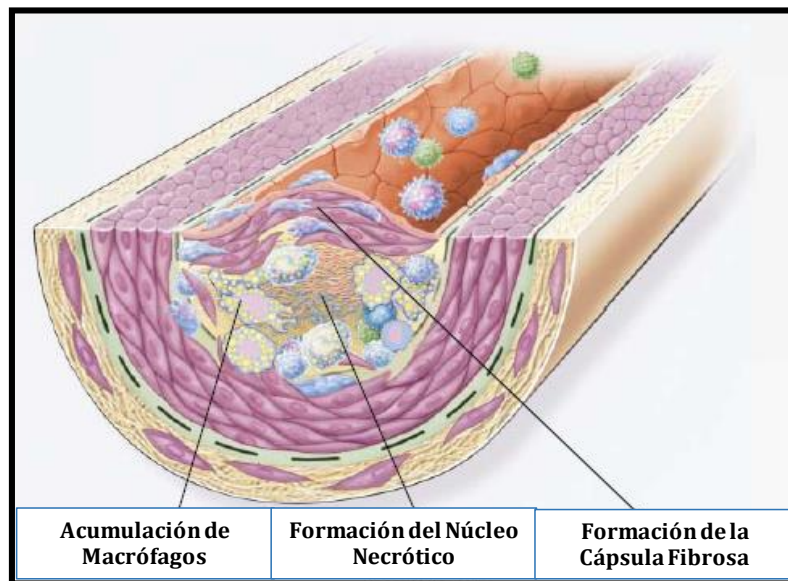


Imagen modificada de Ross R., 1999.

A medida que ocurren estos eventos, la lesión aterosclerótica aumenta de tamaño pudiendo llegar a provocar la estenosis vascular. La estabilidad de la placa de ateroma depende, entre otros factores, del aumento de la actividad de las enzimas hidrolíticas producidas por los macrófagos que degradan la matriz extracelular, de la inhibición de la producción de colágeno por parte de las CMLVs y de la promoción de la apoptosis de las diversas células que la constituyen. Esto es debido a que estos acontecimientos debilitan la cápsula fibrosa de la placa de ateroma, haciéndola más frágil y propensa a su ruptura, de manera que cualquier fuerza mecánica puede fragmentarla con la consiguiente formación de un trombo (Libby et al. 1996; Libby 1995).

1.2.5. COMPLICACIONES DE LA ATEROSCLEROSIS

La complicación más frecuente de la Aterosclerosis es la formación de un trombo, de ahí que a veces se empleó el término de enfermedad aterotrombótica en un intento de incluir

ambos procesos en una misma entidad (Lahoz & Mostaza 2007). La formación del trombo se produce mediante la fisura, erosión, rotura o ulceración de la placa de ateroma. Este hecho trae como consecuencia la exposición de superficies procoagulantes y protrombóticas de la placa a la circulación sanguínea, lo que provoca la activación de diversos factores procoagulantes existentes en el torrente sanguíneo (**Ilustración 8**) (Cahill & Redmond 2016; Martínez-González et al. 2001).

Ilustración 8. Inicio, progresión, desestabilización y complicaciones de la Aterosclerosis.

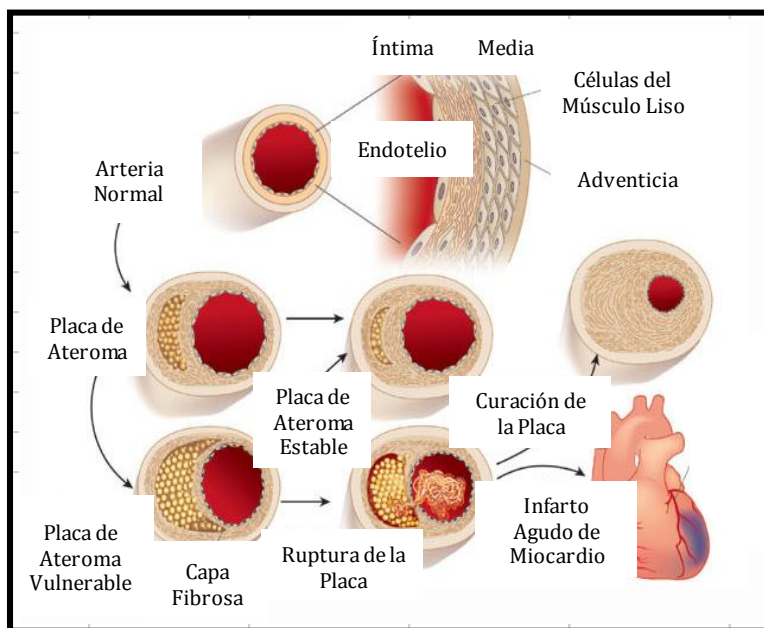


Imagen modificada de Libby P., 2002.

Paradójicamente, las complicaciones trombóticas no siempre ocurren en los sitios de más severo estrechamiento arterial, sino en aquellos lugares donde las placas están formadas por núcleos ricos en lípidos, capas fibrosas finas pobres en colágeno y con pocas CMLVs, pero abundantes macrófagos, angiogénesis, inflamación y remodelación externa (**Ilustración 9**) (Libby et al. 2011; Falk 2006).

Ilustración 9. Corte transversal de placa de ateroma propensa a la ruptura.

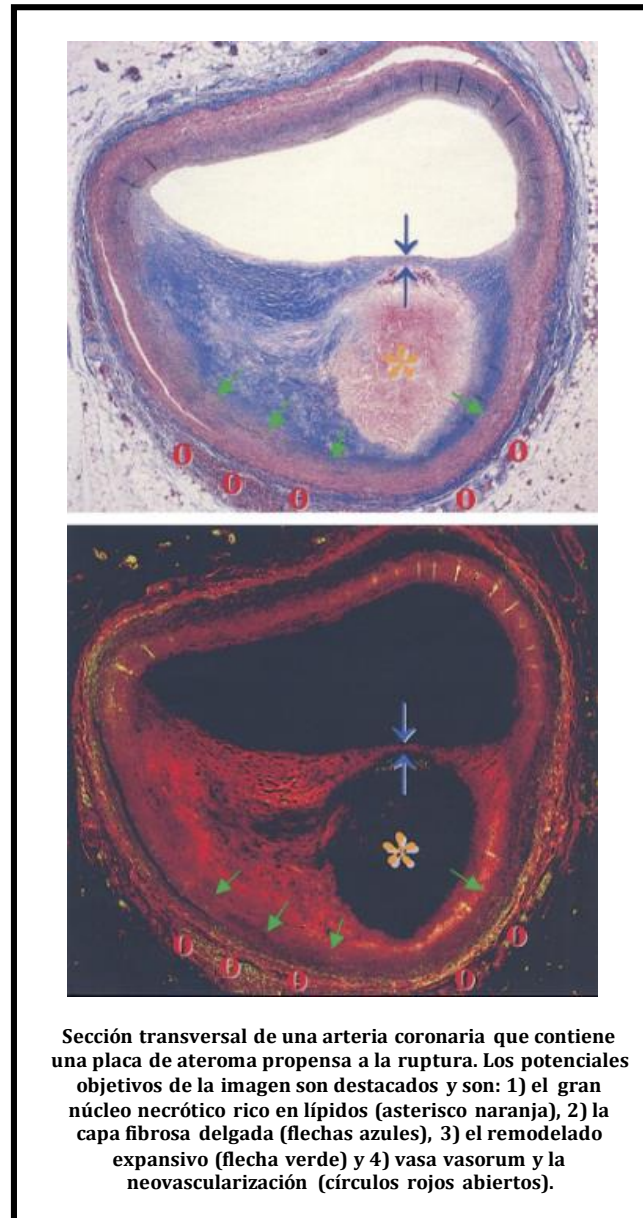
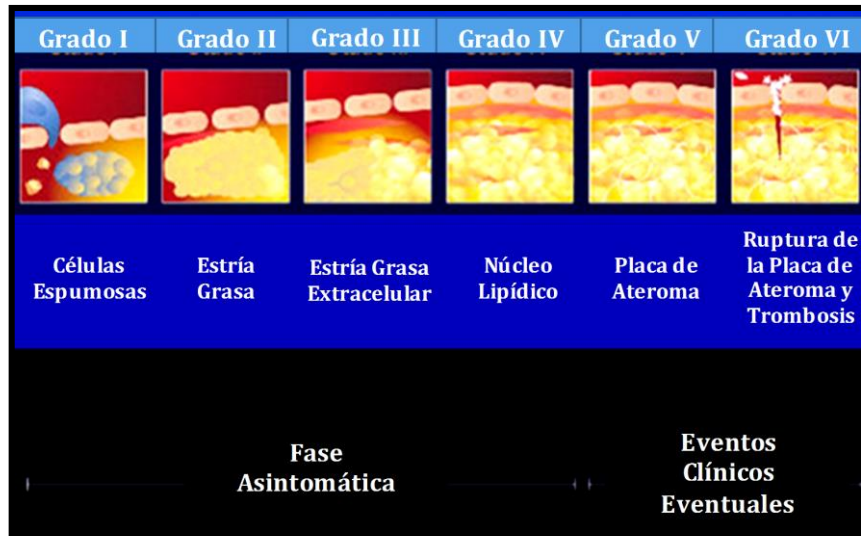
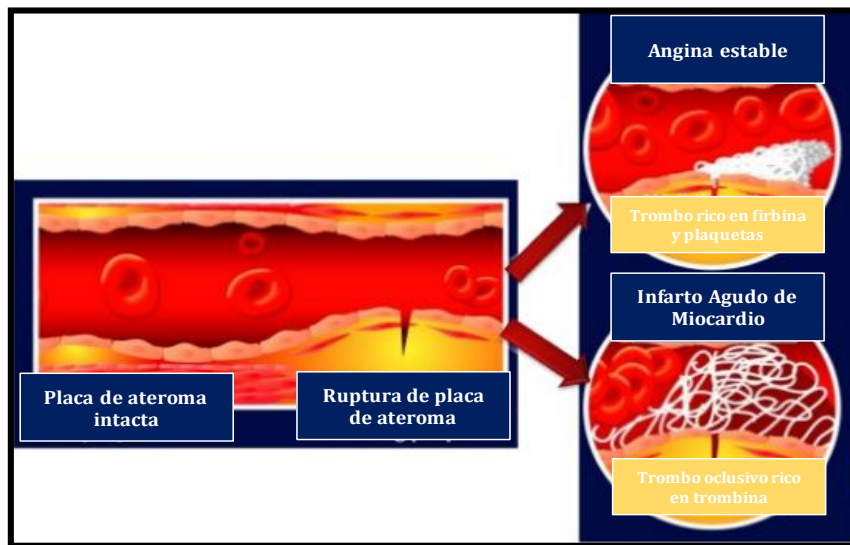


Imagen modificada de Falk E., 2006.

Las placas ateroscleróticas causan manifestaciones clínicas cuando provocan estenosis limitadoras del flujo sanguíneo que conducen a la isquemia del tejido (Libby et al. 2011) o cuando se produce un trombo en su superficie (**Ilustración 10**) (Lahoz & Mostaza 2007). La formación del trombo puede interrumpir el flujo sanguíneo localmente de forma parcial o total, o embolizarse y alojarse en arterias distales, pudiendo producir estas situaciones la aparición de isquemia o necrosis (Libby et al. 2011), y dar lugar a eventos CV agudos (WHO 2011b).

Ilustración 10. Fases asintomáticas y sintomáticas de la Aterosclerosis.

Las manifestaciones clínicas de la Aterosclerosis dependen del lecho vascular principalmente afectado. Si afecta a las arterias coronarias se manifiesta por la aparición de un síndrome coronario agudo, infarto agudo de miocardio (IAM) o muerte súbita. Si afecta a las arterias cerebrales cursa clínicamente como un accidente cerebrovascular agudo (ACVA) o como un accidente isquémico transitorio (AIT). En las arterias periféricas, la expresión clínica es la claudicación intermitente o la isquemia aguda de los miembros inferiores. En cuanto a la forma de presentación puede ser crónica como en la angina estable o la claudicación intermitente, o aguda como ocurre en los síndromes coronarios agudos o en los ictus isquémicos (**Ilustración 11**) (Lahoz & Mostaza 2007).

Ilustración 11. Algunas manifestaciones de la trombosis oclusiva.

A esto hay que añadir que la Aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta a arterias de diferentes localizaciones simultáneamente, aunque con diferente grado de progresión. Por lo tanto, la presencia de afectación vascular en una localización concreta se asocia con un mayor riesgo de desarrollarla en otros lechos vasculares (Lahoz & Mostaza 2007). En la revisión realizada por Fernández y colaboradores se describe que la mitad de los pacientes con claudicación intermitente presentaban, además enfermedad coronaria asociada y un 9% enfermedad cerebrovascular. Respecto a los pacientes con infarto, el 10% presentaban claudicación intermitente y el 6-7% enfermedad cerebrovascular. Y si el primer evento CV era cerebrovascular, una cuarta parte de estos enfermos presentaba claudicación intermitente y un 38% enfermedad coronaria. A lo que hay que sumar que cuando varios territorios vasculares están afectados la mortalidad aumenta, de tal manera que el 90% de los pacientes con enfermedad coronaria sobrevivirán a los cinco años, pero si se asocia en ese momento o con el tiempo a nuevos territorios afectados, la supervivencia disminuye hasta el 62% (Fernández et al. 2003).

El diagnóstico de la Aterosclerosis cuando ya se presentan manifestaciones clínicas es relativamente sencillo. Mucho más problemático es el diagnóstico de la enfermedad aterosclerótica cuando está en fase subclínica, aunque éste pueda ser de vital importancia para evitar el primer episodio agudo que puede ser mortal o dejar importantes secuelas. A este respecto, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica asintomática puede ser especialmente eficiente (Lahoz & Mostaza 2007).

1.3. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR DE LA ATEROSCLEROSIS

La Aterosclerosis, como se ha visto en apartados anteriores, es la principal causa de ECV (Lönn et al. 2012) y de mortalidad a nivel mundial (Barquera et al. 2015). Por esta razón, constituye un grave problema internacional de salud pública. En este sentido, resulta especialmente eficiente para reducir la morbilidad CV invertir en prevención primaria actuando sobre los FRCV ateroscleróticos (WHO 2011b).

Un FRCV se define como la característica biológica o conducta que aumenta la probabilidad de padecer o morir de ECV en los sujetos que la presentan (Kannel et al. 1961). Los FRCV son predictores independientes de ECV y de eventos CV (Khot 2003). Entre los FRCV ateroscleróticos se encuentran FRCV tradicionales o clásicos (HTA, diabetes, dislipemias, sobrepeso/obesidad, edad avanzada, hábito tabáquico, alimentación poco saludable, sedentarismo, consumo nocivo de alcohol, predisposición genética de riesgo, etc.) (WHO 2011b) y FRCV emergentes como la DE y los niveles circulantes elevados de cLDLx (Ras et al. 2013; Xu et al. 2014; Shechter et al. 2009; Shechter et al. 2014; Corrado et al. 2008; Johnston et al. 2006b; Shimada et al. 2004; Salonen et al. 1992; Bayés et al. 2006; Shoji et al. 2002; Tsutsui et al. 2002; Erkkilä et al. 2005; Yeboah et al. 2009; Inaba et al. 2010; Bonetti et al. 2003; Gutiérrez et al. 2013; Kuvini et al. 2001; Trpkovic et al. 2015; Itabe 2003; Huang et al. 2012; Ehara et al. 2001; Meisinger et al. 2005).

1.3.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR TRADICIONALES O CLÁSICOS

1.3.1.1. HIPERTENSIÓN

La hipertensión arterial (HTA), también conocida como presión arterial alta o elevada, es un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una presión persistentemente alta que puede dañarlos (WHO 2017b).

La presión arterial sistólica (PAS) hace referencia a la presión arterial más alta acontecida en los vasos sanguíneos y ocurre cuando el corazón se contrae o late. Por otro lado, la presión arterial diastólica (PAD) es la presión arterial más baja ocurrida en los vasos sanguíneos y se produce entre los latidos del corazón cuando el músculo cardíaco se relaja. La presión sanguínea normal y óptima de un adulto se define como una PAS <120 mmHg y una PAD <80 mmHg (James et al. 2014; WHO 2013; SEH-LELHA 2005; Chobanian et al.

2003). Sin embargo, los beneficios CV de la presión arterial normal se extienden a niveles inferiores tanto de la PAS (105 mmHg) como de la PAD (60 mmHg) (WHO 2013). No observándose asociación directa con la mortalidad CV cuando los valores de la presión arterial se sitúan por debajo de 115/75 mmHg (Lewington et al. 2002).

Esta situación es contraria a lo observado ante valores de preHTA (PAS: 120-139 mmHg o PAD: 80-89 mmHg), establecidos por el Séptimo Informe del Comité Nacional de los Estados Unidos de América sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC 7, *siglas en inglés*) (Chobanian et al. 2003), los cuales incrementan el riesgo de morbimortalidad CV (Lewington et al. 2002; Guo et al. 2013; Huang et al. 2014; Wang et al. 2013; Huang et al. 2013; Lehmann et al. 2016) y constituyen un marcador temprano de Aterosclerosis (Im et al. 2014).

A esto hay que añadir la frecuente evolución de la preHTA a HTA (De Marco et al. 2009; Vasan et al. 2001), aumentando así aún más el riesgo de morbimortalidad CV (Stamler et al. 1993; Benetos et al. 2001; Benetos et al. 2002; Miura et al. 2001; Sesso et al. 2000). En este sentido, se ha observado en diversos estudios, entre los que se encuentran el Strong Heart Study y el Framingham Study, cómo un alto porcentaje de sujetos con preHTA aparentemente sanos (38% y 37,3%, respectivamente) progresaban a HTA en un periodo de cuatro años (De Marco et al. 2009; Vasan et al. 2001). Estos autores, además observaron cómo los valores basales de PAS se comportan como un predictor independiente de la incidencia de HTA, aumentando considerablemente el riesgo de padecerla cuando PAS incrementa en 10 mmHg (De Marco et al. 2009).

La HTA, en cifras, se define como una PAS ≥ 140 mmHg y/o PAD ≥ 90 mmHg (WHO 2013). Esta patología en la actualidad afecta a 1 billón de personas en todo el mundo, estimándose que cause 9,4 millones de muertes anuales a nivel mundial (WHO 2013). El aumento de la prevalencia de la HTA se atribuye al crecimiento de la población, al envejecimiento de la misma y a los FRCV conductuales (alimentación poco saludable, consumo nocivo del alcohol, inactividad física⁵⁵, exceso de peso, mala gestión del estrés, etc.) (WHO 2013).

La HTA es uno de los FRCV ateroscleróticos más importantes a nivel mundial, al ser el causante del 62% de los accidentes cerebrovasculares (ACV) y del 49% de los ataques cardíacos (WHO 2002; WHO/ISH 2003; WHO/ISH 2004). A esto hay que añadir que la HTA suele ir acompañada de otros FRCV (diabetes, dislipemias, sobrepeso/obesidad, hábito tabáquico, dietas inadecuadas, inactividad física, edad avanzada, predisposición genética,

DE, etc.), que interactúan con ella y aumentan el riesgo de sufrir ataques cardíacos, ACV y otras complicaciones de la HTA (WHO 2013). En este sentido, el avance de la edad duplica el riesgo por cada incremento de la presión arterial de 20/10 mmHg a partir de niveles de 115/75 mmHg (WHO 2011b).

1.3.1.2. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que se produce. La diabetes es definida bioquímicamente por una glucemia en ayunas $\geq 7,0$ mmol/L (≥ 126 mg/dL) (WHO 2016c; ADA 2012) o bien por una glucemia postprandial $\geq 11,1$ mmol/L (≥ 200 mg/dL) 2 horas después de haber bebido una solución con 75 g de glucosa (WHO 2017c). Si no aparecen las manifestaciones clínicas clásicas, el diagnóstico se puede efectuar cuando existen ambas pruebas sanguíneas anormales en dos días distintos (WHO 2017c).

Por otra parte, hay que distinguir entre la diabetes de tipo I y la diabetes de tipo II. La diabetes de tipo I (también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia) se caracteriza por una producción deficiente de insulina que requiere la administración diaria de esta hormona (WHO 1999). La diabetes de tipo I representa sólo al 5-10% de los diabéticos y se produce como resultado de la destrucción, de carácter autoinmune, de las células β pancreáticas (ADA 2012). La diabetes de tipo II (también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta) sin embargo, se debe a una utilización ineficaz de la insulina existente (WHO 1999). Este tipo de diabetes representa aproximadamente al 90-95% de los diabéticos a nivel mundial (ADA 2012). Y se debe en gran medida a una dieta inadecuada, a un peso corporal excesivo y a la inactividad física (WHO 2016a). En este sentido, el riesgo de desarrollar diabetes de tipo II aumenta cuando existen otros FRCV como la obesidad, el sedentarismo, las dietas inadecuadas, la HTA, las dislipemias, la predisposición genética, etc. (ADA 2012; WHO 2011b). Hasta hace poco, este tipo de diabetes solo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se detecta en niños (WHO 2016c).

Por otro lado, la glucemia alterada en ayunas o prediabética (100-125 mg/dL) (Expert Committee 1997; Genuth et al. 2003; ADA 2012) constituye un estado de transición entre la normalidad y la diabetes (WHO 1999). Este estado supone un factor de riesgo tanto para el

desarrollo de la diabetes (WHO 2016a; WHO 2011b) como para la morbilidad CV (DeFronzo & Abdul-Ghani 2011; WHO 2011b; Hanna-Moussa et al. 2009).

La diabetes supone un importante problema de salud pública en la actualidad, al haber aumentado sin pausa su prevalencia en las últimas décadas (WHO 2016c). A este respecto, se estima que 422 millones de adultos padecían diabetes en el año 2014 en todo el mundo, frente a los 108 millones que presentaban dicha patología en el año 1980 (WHO 2016c). Esto supone un cambio en la prevalencia mundial de la diabetes en adultos (mayores de 18 años) que va desde el 4,7% en 1980 al 8,5% en 2014 (WHO 2016a).

En este sentido, es importante señalar que la diabetes es un importante FRCV aterosclerótico (WHO 2011b). De hecho, las personas diabéticas presentan enfermedad aterosclerótica de forma más temprana y agresiva que los no diabéticos (Jay et al. 2006). Esta condición incrementa el riesgo de mortalidad CV (The Emerging Risk Factors Collaboration et al. 2010; Hu et al. 2001; Lotufo et al. 2001), observándose cómo los adultos con diabetes presentan el doble de riesgo de sufrir un evento aterosclerótico agudo, como un IAM o un ACV, que los adultos sin esta patología (WHO 2011b; The Emerging Risk Factors Collaboration et al. 2010). En este aspecto, hay que destacar que la mayoría de las muertes acontecidas en diabéticos se producen por eventos CV (WHO 2011b).

1.3.1.3. DISLIPEMIAS

Las dislipemias son una serie de condiciones patológicas cuyo elemento común es una alteración del metabolismo lipoproteínico, con su consecuente alteración de los niveles séricos de lípidos y lipoproteínas. La determinación de los niveles séricos de lípidos, lipoproteínas y apoproteínas permite el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de las diferentes dislipemias (Méndez González et al. 2008).

Las dislipemias son un importante FRCV aterosclerótico (WHO 2011b). En este sentido, tanto los niveles por encima de las recomendaciones establecidas (Stone et al. 2014; NCEP/ATP III 2002) para el colesterol total (≥ 200 mg/dL), cLDL (≥ 160 mg/dL) y triglicéridos (TG) (≥ 150 mg/dL) como los niveles por debajo de las recomendaciones para el cHDL (≤ 50 mg/dL en mujeres y ≤ 40 mg/dL en hombres) constituyen un FRCV aterosclerótico (Handelsman & Shapiro 2017; ESC/EAS 2016; Gao et al. 2016; Stone et al. 2014; Yang et al. 2014; Isaacs et al. 2013; WHO 2011b; ESC/EAS 2011; Arsenault et al. 2011; Sampietro et al. 2005; NCEP/ATP III 2002; Wilson et al. 1998). Asimismo, la OMS estima

que la hipercolesterolemia causa 2,6 millones de muertes cada año y aumenta el riesgo de padecer eventos ateroscleróticos agudos como cardiopatías y ACV (WHO 2011b; WHO 2011c).

Incluso se ha llegado a definir un tipo de dislipemia como “dislipemia aterogénica”. Esta dislipemia es una alteración lipídica y lipoproteica caracterizada por la asociación de bajos niveles plasmáticos de cHDL con elevados niveles de TG y de partículas cLDL pequeñas y densas, con o sin incremento moderado de los niveles séricos de cLDL (SEA 2013; NCEP/ATP III 2002). Esta “tríada lipídica” incrementa de forma importante el riesgo de Aterosclerosis (Valensi et al. 2016; Berneis et al. 2009; Arca et al. 2007) y de eventos CV (Sirimarco et al. 2014; Arca et al. 2007; Von Eynatten et al. 2007). Las características típicas de las personas con dislipidemia aterogénica son la obesidad abdominal, la resistencia a la insulina y la inactividad física (Bosomworth 2013; NCEP/ATP III 2002; NIH 1998). Por consiguiente, este tipo de dislipemia es muy prevalente en sujetos con diabetes de tipo II, síndrome metabólico u obesidad visceral (Hwang et al. 2016; Bosomworth 2013; SEA 2013; Hamilton & Watts 2013; Agouridis et al. 2013; Kumar & Singh 2010; Nesto 2005; NCEP/ATP III 2002; NIH 1998).

En la actualidad, las evidencias clínicas indican que esta dislipemia es altamente aterogénica de forma independiente y adicional a los niveles séricos de cLDL (SEA 2013). Por lo tanto, aunque los niveles de cLDL sean tratados, si no se modifica las características de la dislipemia aterogénica, se mantendrá un riesgo cardiovascular (RCV) residual (Sirimarco et al. 2014; SEA 2013; NCEP/ATP III 2002). Esto es consecuencia de la acción individual y sinérgica de sus tres componentes principales. En este aspecto, al disminuir los niveles plasmáticos de cHDL también descende su capacidad antiaterogénica (transporte reverso de las cLDL, efecto antioxidante inhibiendo la oxidación de las cLDL, acción vasodilatadora, antiinflamatoria, antitrombótica, antiapoptótica y reparadora del endotelio vascular, etc.), comportándose como un predictor independiente de ECV (Stone et al. 2014; SEA 2013; NCEP/ATP III 2002). En este sentido, existe una relación inversa entre los niveles de cHDL y el RCV (SEA 2013). Este RCV disminuye si los niveles plasmáticos de cHDL son >60 mg/dL en ambos sexos (SEA 2013).

Por otra parte, la presencia de hipertrigliceridemia tiene una acción aterogénica a través de múltiples mecanismos. Algunos de los cuales son contribuir a la formación del depósito lipídico en la capa íntima arterial, aumentar la actividad monocitaria, estimular la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de factores procoagulantes, y promover la DE. También

contribuye a la aterogénesis al estar asociada a otras alteraciones metabólicas, como son el descenso de los niveles de cHDL, la elevación de los niveles de las cLDL pequeñas y densas o los estados de resistencia a la insulina en sujetos con elevado perímetro de cintura con exceso de adiposidad intraabdominal (SEA 2013).

Por otra parte, las partículas de cLDL pequeñas y densas tienen un importante papel en el proceso aterosclerótico, debido fundamentalmente a su gran susceptibilidad para ser oxidadas y convertirse en cLDLox (SEA 2013; Chait et al. 1993).

1.3.1.4. SOBREPESO Y OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial fruto de la interacción entre el genotipo y el ambiente (SEEDO 2007). El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva del tejido adiposo corporal, la cual se asocia con el desarrollo de Aterosclerosis (WHO 2016b; Appiah et al. 2016; WHO 2011b; SEEDO 2007) y de otras patologías (WHO 2016b).

El índice de masa corporal (IMC) es uno de los métodos más utilizados para clasificar el grado de obesidad (WHO 2000). El IMC es una medida de asociación que permite clasificar el estado ponderal de un sujeto. En este sentido, se considera que el sujeto presenta sobrepeso cuando tiene un IMC entre 25,0 y 29,9 kg/m² y obesidad cuando el sujeto tiene un IMC $\geq 30,0$ kg/m² (SEEDO 2007).

Por otra parte, la circunferencia de la cintura (CCi) es un mejor indicador de la adiposidad, al indicar la distribución de la grasa corporal y el grado de adiposidad intraabdominal o visceral (y sus cambios con la pérdida de peso) (SEEDO 2007). En consecuencia, la CCi es considerada, desde hace años, como un buen indicador de la adiposidad abdominal (NCEP/ATP III 2002), la cual está íntimamente relacionada con el RCV (De Koning et al. 2007). En consonancia con esto, los valores de riesgo del CCi están relacionados con un incremento del RCV (Nishida et al. 2010; NCEP-ATP III 2001). Estos valores de riesgo fueron establecidos en el año 2001 por el Programa Nacional de Estados Unidos de América de Educación sobre el Colesterol (NCEP, *siglas en inglés*) en su III Panel de Tratamiento en Adultos (ATP III, *siglas en inglés*), y son en hombres >102 cm y en mujeres >88 cm (NCEP/ATP III 2001). Posteriormente, en el año 2005 la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, *siglas en inglés*) estableció nuevos valores de riesgo para el CCi teniendo en cuenta, no solo las diferencias establecidas por el sexo como las guías anteriores, sino

también el grupo étnico al que pertenece el sujeto. Los valores de riesgo del CCI establecidos por la IDF en población europea son en hombres ≥ 94 cm y en mujeres ≥ 80 cm (Alberti et al. 2006).

Asimismo, la causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es el desequilibrio energético existente entre las calorías consumidas y el gasto energético, a favor de las primeras (WHO 2016b). Este desequilibrio es propiciado por el estilo de vida que se lleva en la actualidad en los países desarrollados y en vías de desarrollo, donde ha aumentado la ingesta de alimentos con alto contenido calórico y ha descendido la actividad física (WHO 2016b; FESNAD-SEEDO 2011). Esto último se ve reforzado por la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, los nuevos modos de transporte y la creciente urbanización (WHO 2016b). Estos cambios en los hábitos alimentarios y de actividad física son, generalmente, consecuencia de cambios ambientales y sociales asociados al desarrollo y a la falta de políticas de apoyo en diversos sectores como la salud, la agricultura, la educación, la planificación urbana, el medio ambiente y la industria alimentaria (WHO 2016b).

En este sentido, la prevalencia de la obesidad a nivel mundial no cesa de aumentar, observándose cómo desde el año 1980 se han más que duplicado las cifras (WHO 2016b). A este respecto, en el año 2014 se estimó que más de 1.900 millones de adultos (≥ 18 años) tenían sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos (WHO 2016b). Esto supone que el 39% de los adultos a nivel mundial padecían sobrepeso (38% de los hombres y 40% de las mujeres) y que el 13% presentaban obesidad (11% de los hombres y 15% de las mujeres) en dicho año (WHO 2016b).

La mortalidad que causa el sobrepeso y la obesidad se calcula en más de 2,8 millones de muertes anuales a nivel mundial (WHO 2011b). En este sentido, es bien conocido cómo el sobrepeso y la obesidad son considerados como un importante FRCV (WHO 2016b; WHO 2011b; SEEDO 2007). Esto se debe a que su presencia incrementa el riesgo de desarrollar Aterosclerosis y su mortalidad (WHO 2016b; Appiah et al. 2016; WHO 2011b; SEEDO 2007), además del riesgo de morbilidad CV total (WHO 2016b; Appiah et al. 2016; Flint et al. 2010; WHO 2011b; Van Dis et al. 2009; Karastergiou & Fried 2013; Reis et al. 2009; Zhang et al. 2008; Nicklas et al. 2004). Este incremento del RCV es en parte causado a su íntima relación con otros FRCV, como la HTA (Rahman et al. 2017; Seven et al. 2016; Piper et al. 2014; Arabshahi et al. 2014; Nyamdorj et al. 2008; Redon 2001), la diabetes de tipo II (Rahman et al. 2017; Nyamdorj et al. 2008; Vazquez

et al. 2007; Boyko et al. 2000; Hartz et al. 1983) y las dislipidemias/dislipemias aterogénicas (Hwang et al. 2016; Poledne et al. 2015; SEEDO 2007; Nguyen-Duy et al. 2003; Denke et al. 1993; Olefsky et al. 1974; Garrison et al. 1980).

Asimismo, cabe señalar que tanto el sobrepeso como la obesidad incrementan el riesgo de padecer enfermedades ateroscleróticas tan importantes como las cardiopatías y las enfermedades cerebrovasculares (WHO 2016b; Canoy et al. 2013; SEEDO 2007). En consonancia con lo cual, se ha observado que las tasas de mortalidad por enfermedad cerebrovascular y cardiopatía isquémica aumentan de forma progresiva a partir de un IMC mayor a 24,9 kg/m² (Mongraw-Chaffin et al. 2015; Hu et al. 2007; Kurth et al. 2005; Martínez et al. 2004). En este aspecto, es importante comentar cómo la relación entre el IMC y el RCV no es lineal sino en forma de “U” (Appiah et al. 2016; Karas et al. 2016) o de “J” (Wang et al. 2015), por lo que la mortalidad CV también se ve incrementada cuando el IMC es inferior a 18,5 kg/m² (Canoy et al. 2013; Hu et al. 2007). Este hecho se hace más patente en aquellos sujetos que han sido sometidos a intervenciones cardiovasculares (Park et al. 2013).

1.3.1.5. EDAD AVANZADA

El envejecimiento es considerado como un proceso endógeno y naturalmente irreversible, que universalmente afecta a todos los sujetos (Strehler 1962). Desde un punto de vista biológico, el envejecimiento es la consecuencia de la acumulación progresiva, a lo largo del tiempo, de una gran variedad de daños moleculares y celulares, que se hacen especialmente patentes en las células postmitóticas como son la inmensa mayoría de las neuronas, células del corazón y del músculo esquelético (Barja 2013). En consecuencia, a edades avanzadas se suele presentar un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, y un mayor riesgo de enfermedad y muerte (Harman 1981).

Un desafío importante en este aspecto, es la enorme diversidad de los estados de salud y funcionales que presentan los sujetos de edad avanzada (WHO 2015c; WHO 2001). Dicha diversidad no es casual (WHO 2015c), ya que el envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial controlado por diversos factores ambientales y genéticos (Osiewacz 1997). En este sentido, el envejecimiento depende de diversas características personales como son los factores genéticos, físicos, psicológicos, cognitivos, medioambientales, sociales, económicos, de estilo de vida (nutrición, actividad física, hábito tabáquico, consumo de alcohol.), etc. (Morley 2017; de Lucia et al. 2017; Balasubramanian et al. 2017; Bloch et al.

2017; De Marco et al. 2016; Montero & Díaz-Cañestro 2016; Ben-Sadoun et al. 2016; WHO 2015c; Panza, Solfrizzi, Barulli, et al. 2015; Panza, Solfrizzi & Logroscino 2015; Di Bona et al. 2014; Ajilore et al. 2014; Kar & Wright 2014; Dato et al. 2013; Dickinson et al. 2013; Anon 2013; Steves et al. 2012; Soerensen 2012; Lamar et al. 2012; Vongvatcharanon et al. 2010; Marmot et al. 2008; Dannefer 2003; Blain et al. 2001; Morgan et al. 2000; Katz 2000; Bowling & Grundy 1997; Guralnik & Kaplan 1989).

En la actualidad, por primera vez en la historia, la mayoría de las personas pueden aspirar a vivir más de 60 años (WHO 2015c). Este aumento de la esperanza de vida en los países de ingresos altos se debe, fundamentalmente, al descenso de la mortalidad entre las personas mayores (WHO 2015c).

El envejecimiento de la población tiene profundas consecuencias para la salud y para los sistemas sanitarios (WHO 2015c), al ser la edad avanzada un factor de riesgo para múltiples patologías (Wang & Bennett 2012; Khrapko & Turnbull 2014; Barja 2013; Wang et al. 2009; Bender et al. 2006; Barja & Herrero 2000; Harman 1981; NCEP/ATP III 2002). Entre estas patologías se encuentra la Aterosclerosis (Wang & Bennett 2012; WHO 2011b). En este sentido, el envejecimiento de la población ha acelerado el crecimiento de la carga mundial de las ECV (WHO 2011b), pudiéndose observar cómo el avance de la edad aumenta, de forma abrupta, el riesgo de desarrollar Aterosclerosis (NCEP/ATP III 2002). De hecho, en sujetos de edad avanzada se producen más eventos ateroscleróticos que en sujetos más jóvenes (NCEP/ATP III 2002).

Este elevado riesgo de Aterosclerosis es debido a que la edad avanzada refleja la progresión del proceso aterosclerótico del sujeto, acontecida por la exposición acumulada a múltiples FRCV (NCEP/ATP III 2002). Aunado al hecho de que estos sujetos presentan una mayor senescencia celular que promueve la aterogénesis (Wang & Bennett 2012).

Asimismo, el envejecimiento de la arteria produce un engrosamiento de la íntima y de la media (remodelación vascular), así como a una pérdida gradual de la elasticidad arterial. Eventos que conducen a la rigidez del vaso sanguíneo (Bolton & Rajkumar 2011) a través de múltiples procesos patológicos. Muchos de estos procesos son característicos tanto del envejecimiento vascular como del proceso aterosclerótico (O'Rourke & Hashimoto 2007; Virmani et al. 1991). Este es el caso, por ejemplo, de la disminución de las CMLVs, y del aumento de la deposición de colágeno y de fracturas de las laminillas de elastina en la túnica media. Estos eventos patológicos conducen a la dilatación de los vasos sanguíneos y a un

aumento del tamaño de la luz (Wang & Bennett 2012; Åstrand et al. 2011), los cuales serán posteriormente acompañados de una remodelación hipertrófica y engrosamiento compensatorio de la pared arterial (Åstrand et al. 2011).

Algunas de las causas que promueven estos cambios en los vasos sanguíneos, son que los sujetos de edad avanzada presentan un incremento en los niveles de compuestos glicosilados (Zieman & Kass 2004), cambios en las isoformas del colágeno y en la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs, *siglas en inglés*) (Åstrand et al. 2011), además de estímulos tróficos como la señalización de la angiotensina II (Wang & Bennett 2012; Wang et al. 2007). Esto, aparte de producir la citada rigidez vascular (Åstrand et al. 2011), promueve la aparición de HTA (Franklin et al. 1997). La presencia de HTA puede estimular, aún más, la producción de colágeno, la DE y la rigidez arterial.

Además, los vasos sanguíneos envejecidos muestran un perfil proinflamatorio (Wang et al. 2007) y una mayor captación de cLDLox (Hashimoto et al. 1991), lo cual contribuye al proceso aterosclerótico (Wang & Bennett 2012).

Por otra parte, hay muchos factores que predisponen a que se produzca el envejecimiento vascular, entre los que se incluye la predisposición genética y otros FRCV ateroscleróticos (Wang & Bennett 2012; NCEP/ATP III 2002). En este sentido, el envejecimiento arterial tiene una significativa predisposición genética y varía entre razas. A este respecto, se ha observado que los sujetos afrocaribeños presentan un envejecimiento arterial acelerado, una rigidez aórtica aumentada y un grosor de la carótida mayor en comparación con los sujetos europeos y asiáticos (Kalra et al. 2005; Chaturvedi et al. 2004; Chaturvedi 2003). Esto indica la influencia de la variabilidad genética debida a mutaciones y/o polimorfismos en loci genéticos específicos que controlan múltiples aspectos del envejecimiento vascular.

Entre los otros FRCV ateroscleróticos que influyen de manera importante al envejecimiento arterial se encuentran el hábito tabáquico, el consumo nocivo de alcohol y la diabetes. El tabaquismo aumenta la rigidez y la presión arterial (Mahmud & Feely 2003), y promueve la senescencia de CE y fibroblastos (Nyunoya et al. 2009; Farhat et al. 2008). Mientras que el consumo nocivo de alcohol se encuentra relacionado con una mayor rigidez vascular (Sierksma, Muller, et al. 2004; Sierksma, Lebrun, et al. 2004; Mahmud & Feely 2002).

A esto hay que añadir que los ancianos son propensos a presentar hiperglucemias que aumentan su RCV (Matsui-Hirai et al. 2011). Además, la edad avanzada comparte muchos

mecanismos, por los cuales disminuyen la distensibilidad arterial, con la hiperglucemia o con la glucemia basal alterada. Este es el caso de la glicación de la matriz extracelular y de la mayor formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs, *siglas en inglés*) (Wang & Bennett 2012; Stacey et al. 2009). La glicación es un término que describe una reacción no enzimática que produce la modificación postraducciona permanente de los grupos amino de las proteínas por la acción de azúcares reductores, también denominada reacción de Maillard. La glicación es un proceso que ocurre en condiciones fisiológicas *in vivo* y que afecta también a lípidos y ácidos nucleicos. Los AGEs son un grupo heterogéneo de moléculas generadas por medio de reacciones no enzimáticas de glicación y de oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, cuyos niveles elevados han sido relacionados con un aumento del RCV (Karasu 2010). Tanto la glicación como los AGEs aumentan con la edad y se correlacionan con los niveles séricos de glucosa. Este aumento de los AGEs contribuye a producir cambios estructurales y fisiológicos en el sistema CV, como son el aumento de la rigidez vascular y del miocardio, la presencia de DE y la formación de la placa aterosclerótica (Wang & Bennett 2012; Ziemann & Kass 2004). En este sentido, la reducción del consumo de AGEs dietéticos (Lin et al. 2003; Lin et al. 2002) y el control de otros FRCV (Wang & Bennett 2012) puede ejercer efectos ateroprotectores. Además, tanto la edad avanzada como la elevación de la glucemia asociada a la dieta están relacionadas con una mayor senescencia de las células vasculares (Stacey et al. 2009). Esta senescencia pueden ser reducida cuando existen niveles fisiológicos de insulina, los cuales presentan efectos antisenescentes (Matsui-Hirai et al. 2011).

Por otra lado, el envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y del desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, la cual debe adaptarse a esta situación para mejorar al máximo la salud de las personas de avanzada edad, intentando conseguir un envejecimiento saludable (WHO 2015c). En este sentido, la mayoría de los problemas de salud de los sujetos con avanzada edad son el resultado de la existencia de enfermedades crónicas como la Aterosclerosis, la HTA, la diabetes, etc. La mayoría de estas enfermedades se pueden prevenir o retrasar su aparición a través de la práctica durante la vida de hábitos saludables (WHO 2015c). En este aspecto, también es importante la detección, y el tratamiento temprano y eficaz de estos problemas de salud. Todo esto influirá considerablemente a poder cumplir el objetivo de conseguir un envejecimiento saludable del individuo y de la población (WHO 2015c; WHO 2015a; Robare et al. 2011; Newman et al. 2010).

1.3.2. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EMERGENTES

La DE y los niveles circulantes elevados de cLDLox son FRCV ateroscleróticos emergentes ya que, además de ser claves en todo el proceso fisiopatológico de la Aterosclerosis, son predictores independientes de ECV aterosclerótica (Trpkovic et al. 2015; Huang et al. 2012; Park et al. 2011; Yamashina et al. 2003; Holvoet et al. 2001; Suzuki et al. 2002; Faviou et al. 2005; Huang et al. 2008; Wallenfeldt et al. 2004) y de eventos CV (Ruiz-Garcia & Alegria-Barrero 2016; Németh et al. 2016; Xu et al. 2014; Shechter et al. 2014; Careri et al. 2013; Santos-García et al. 2011; Rubinshtein et al. 2010; Shechter et al. 2009; Lau et al. 2008; Karatzis et al. 2006; Salonen et al. 1992; Bayés et al. 2006; Bayés et al. 2003; Holvoet et al. 2004; Meisinger et al. 2005; Naruko 2006; Orchard et al. 1999; Puurunen et al. 1994; Shimada et al. 2004; Shoji et al. 2002; Wallenfeldt et al. 2004; Tsimikas et al. 2006; Tsutsui et al. 2002; Johnston et al. 2006b; George et al. 1999; Kiechl et al. 2007).

En este sentido, hay que destacar que la capacidad predictora de eventos CV de estos FRCV emergentes ha sido comprobada tanto en sujetos con ECV sintomática (Ras et al. 2013; Xu et al. 2014; Ehara et al. 2008; Ehara et al. 2001; Tsutsui et al. 2002; Tsimikas et al. 2003; Shimada et al. 2004) como en sujetos con ECV asintomática (Shechter et al. 2014; Corrado et al. 2008; Shechter et al. 2009; Meisinger et al. 2005; Holvoet et al. 2004; Holvoet et al. 2003). En estos últimos resulta especialmente importante, ya que se estima que entre un 40 y 80% de los sujetos aparentemente sanos o asintomáticos padecen enfermedad aterosclerótica (Ray et al. 2015). Y su detección es una prioridad para la prevención primaria CV (Lobos et al. 2008; Ian Graham et al. 2007).

Por todo ello, medir la función endotelial y los niveles circulantes de cLDLox es clave para evaluar el RCV del sujeto (Yeboah et al. 2009; Inaba et al. 2010; Bonetti et al. 2003; Gutiérrez et al. 2013; Ras et al. 2013; Kuvín et al. 2001; Shechter et al. 2009; Xu et al. 2014; Trpkovic et al. 2015; Itabe 2003; Huang et al. 2012; Ehara et al. 2001; Tsutsui et al. 2002; Meisinger et al. 2005; Shechter et al. 2014; Corrado et al. 2008; Johnston et al. 2006b; Shimada et al. 2004; Salonen et al. 1992; Bayés et al. 2006; Shoji et al. 2002; Erkkilä et al. 2005), y contribuye de manera considerable a clasificar o reclasificar dicho riesgo (ESC/EAS 2016; Van den Oord et al. 2013; Kiechl et al. 2007; Johnston et al. 2006b; Holvoet et al. 2001). Esto es importante, ya que como es bien sabido, ocurren eventos CV en personas que no presentan FRCV tradicionales. De ahí que surja la necesidad de aplicar nuevas herramientas en la práctica clínica que ayuden a evaluar y gestionar el RCV.

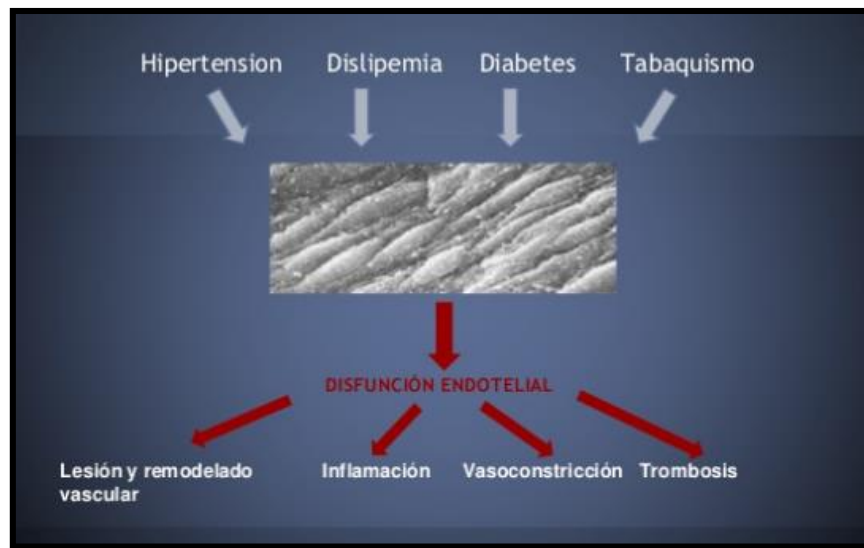
A esto hay que añadir que la detección y mejora de la DE y de los niveles circulantes elevados de cLDL_{ox} ayudan de forma importante a disminuir el RCV (Xu et al. 2014; Ras et al. 2013; Inaba et al. 2010; Kougialis et al. 2010). Por lo tanto, estos FRCV emergentes podrían contribuir de forma clave en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la Aterosclerosis.

1.4. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La DE es un estado patológico sistémico donde existe un desequilibrio en la capacidad de homeostasis vascular del endotelio. Esto provoca la reducción de la vasodilatación, y la promoción de un estado proinflamatorio, prooxidativo y protrombótico a nivel vascular (Cahill & Redmond 2016; Deanfield et al. 2007).

La función endotelial es uno de los contribuyentes más importantes a la salud vascular (Cahill & Redmond 2016; Gutiérrez et al. 2013; Hirase & Node 2012; Ribeiro et al. 2009; Deanfield et al. 2007; Inoue & Node 2006; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001). Esto es debido a que el endotelio vascular responde a alteraciones humorales, neuronales y hemodinámicas para intentar mantener la homeostasis vascular a través de acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas. Estas acciones regulan la permeabilidad, el tono vascular, la adhesión y la trans migración de células inflamatorias, la proliferación y migración de las CMLVs, la supervivencia de diversas células vasculares, la agregación plaquetaria, el balance hemostático/fibrinolítico, y la angiogénesis del vaso sanguíneo (Cahill & Redmond 2016; Deanfield et al. 2007; Kinlay et al. 2001).

Estas alteraciones son provocadas por diversos factores agresores como el humo del tabaco, la presión arterial elevada, las dislipidemias, las hiperglucemias, etc. (**Ilustración 12**) (Shi & Vanhoutte 2017; Sena et al. 2013; Vanhoutte 2009; Thuillez & Richard 2005; Modena et al. 2002; Perticone et al. 2001; Casino et al. 1994; Creager et al. 1990; Drexler 1997; De Meyer & Herman 1997).

Ilustración 12. Promoción de la disfunción endotelial por diversos FRCV.

Asimismo, otros FRCV emergentes como los niveles circulantes elevados de cLDLox, el déficit estrogénico, la hiperhomocisteinemia, etc. (Gradinaru et al. 2015; Valls et al. 2015; Van de Vrede et al. 2013; Drexler 1997), también ponen en riesgo la capacidad del endotelio para mantener la homeostasis vascular (Simionescu 2007).

Si el daño endotelial provocado por estas agresiones fisicoquímicas prospera y se instaura la DE, se produce un cambio fenotípico en las CE y una alteración en su función (Simionescu 2007). La DE es concebida por diversos autores como la alteración fisiopatológica inicial de la Aterosclerosis, la cual desencadena, de forma progresiva, la génesis de los fenómenos histopatológicos que conducen a la conformación de la placa de ateroma y a sus complicaciones. La DE tiene un papel crítico en todo el proceso aterosclerótico (Gutiérrez et al. 2013; Ribeiro et al. 2009; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001). Siendo un estado fisiopatológico clave tanto para la iniciación, como para la progresión y las complicaciones de la Aterosclerosis (**Ilustración 13**) (Cahill & Redmond 2016; Gutiérrez et al. 2013; Ribeiro et al. 2009; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001). Cabe destacar cómo la DE incluso influye significativamente en la transición de un estado estable de ECV a uno inestable, con los riesgos que esto implica (Deanfield et al. 2007).

Ilustración 13. Disfunción endotelial involucrada en la iniciación, progresión y complicaciones de la Aterosclerosis.

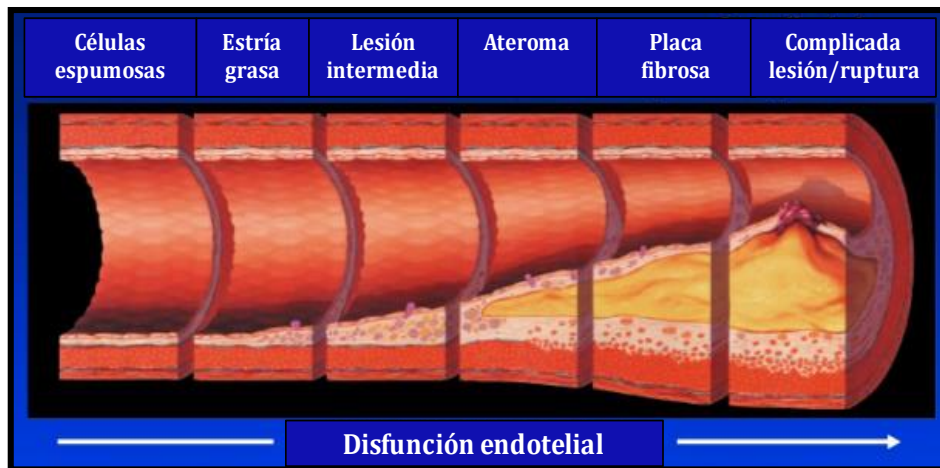


Imagen modificada de Pepine CJ., 1998.

Por todo esto, la DE es considerada como un marcador temprano de Aterosclerosis y un fuerte predictor de eventos CV tanto en sujetos sintomáticos de ECV (Xu et al. 2014; Ras et al. 2013) como en sujetos asintomáticos (Shechter et al. 2014; Shechter et al. 2009; Corrado et al. 2008). En este sentido, algunos autores consideran a la DE como el mejor predictor independiente de eventos CV a largo plazo en sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos, en comparación con FRCV tradicionales (Shechter et al. 2014; Shechter et al. 2009).

En consecuencia, el mantenimiento o recuperación de la normal fisiología endotelial es un punto clave de dianas terapéuticas presentes y futuras dirigidas al control evolutivo de la Aterosclerosis (Li et al. 2013; Gao et al. 2012; Reriani et al. 2011; Bonetti et al. 2003; Modena et al. 2002).

1.4.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La activación endotelial y la posterior DE describen el conjunto de transformaciones producidas en el endotelio vascular, que alteran los mecanismos regulatorios que normalmente operan en el endotelio sano. La progresión que va desde los primeros cambios observados en el endotelio vascular comprometido (DE) al desarrollo y complicaciones de la Aterosclerosis, es multifactorial y compleja (Yang & Ming 2006).

La instauración de la DE se produce con anterioridad a la aparición de las primeras lesiones histopatológicas de la Aterosclerosis, representando un paso inicial reversible en el desarrollo de la aterogénesis. Por esta razón, la identificación clínica temprana de la DE puede convertirse en una herramienta importante en la prevención o reversión de la Aterosclerosis.

El endotelio sano, como se ha visto en apartados previos, tiene múltiples funciones como controlar la permeabilidad vascular a los diferentes componentes del plasma, regular el tono vasomotor a través de la síntesis de diversos factores vasoactivos [óxido nítrico (NO, *siglas en inglés*), endotelina 1 (ET-1), etc.], e intervenir en la interacción con leucocitos mediante la participación de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, la familia de las selectinas, etc.) y la secreción de moléculas quimiotácticas [proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, *siglas en inglés*), interleucina 8 (IL-8), etc.] (Dvorkin & Cardinali 2010).

También controla el crecimiento del músculo liso vascular mediante factores que inhiben el crecimiento (heparina, glucosaminoglucanos, NO, etc.) y que lo promueven [PDGF, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, *siglas en inglés*), FGF, ET-1, etc.], y lleva a cabo funciones antiagregantes y antitrombóticas que evitan, en condiciones normales, la adherencia de las plaquetas a la pared vascular (Dvorkin & Cardinali 2010).

A esto hay que añadir su participación en la hemostasia, su intervención en la conversión de angiotensina I (ANG I, *siglas en inglés*) a angiotensina II (ANG II, *siglas en inglés*), su participación en el desarrollo y remodelado de los vasos sanguíneos (angiogénesis), su acción secretora de componentes estructurales de la matriz extracelular (colágeno, glucosaminoglucanos y fibronectina), y su intervención en el metabolismo de los lípidos plasmáticos al estar ligada la lipasa de lipoproteínas (LPL, *siglas en inglés*) a la superficie de las CEs por los heparánsulfatos (Dvorkin & Cardinali 2010).

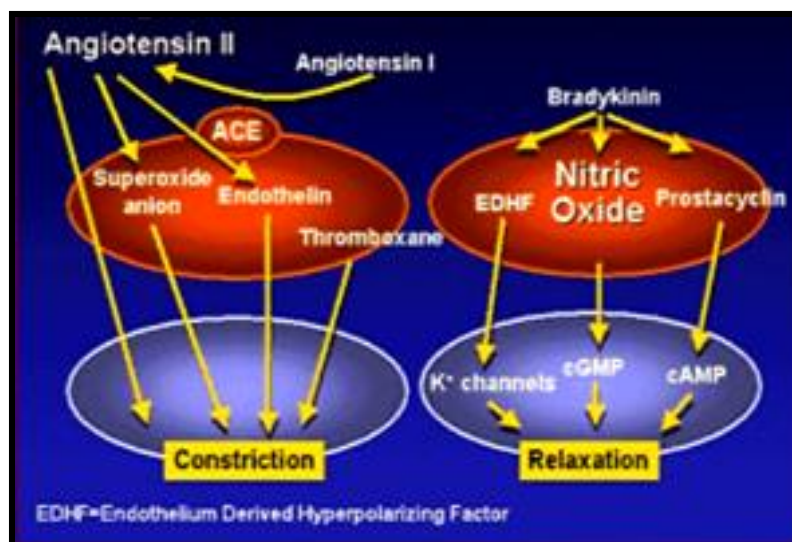
Si el endotelio sano se ve lesionado de forma reiterada por diversas agresiones fisicoquímicas, se promoverá el deterioro endotelial hasta instaurarse la DE. Conforme se va instaurando la DE, la homeostasis vascular se va perdiendo produciéndose una alteración de la vasodilatación mediada por el endotelio y un aumento de la reactividad vascular (vasorreactividad alterada). También se observa una reducción en sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y antitrombóticas. El progreso de la DE produce además, el ya citado aumento de la permeabilidad de la barrera endotelial (disfunción de la barrera), la adhesión y migración de leucocitos a la capa íntima arterial, y la adhesión y agregación

plaquetaria al endotelio. Esto promueve en última instancia la formación de trombos (Cahill & Redmond 2016).

Entre los procesos moleculares que contribuyen a estos fenómenos se incluye la disminución de la biodisponibilidad del NO, la expresión de moléculas de adhesión (entre las que se encuentran VCAM-1, ICAM-1 y la familia de las selectinas), y la síntesis de factores proinflamatorios y protrombóticos en el vaso sanguíneo (Cahill & Redmond 2016; Szmitko, Wang, Weisel, de Almeida, et al. 2003; Szmitko, Wang, Weisel, Jeffries, et al. 2003).

El NO es uno de los factores producidos por las CEs que intervienen en la homeostasis vascular (Cahill & Redmond 2016). Se encuentra dentro de los factores denominados vasoactivos (vasodilatadores y vasoconstrictores), los cuales son los encargados de regular el tono vascular. El NO es un potente vasodilatador. Otros vasodilatadores producidos por la CEs, aunque menos potentes, son la prostaciclina (PGI₂, *siglas en inglés*) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF, *siglas en inglés*). Dentro de los vasoconstrictores se encuentra la ET-1, la ANG II, el tromboxano A₂ (TXA₂, *siglas en inglés*), la prostaglandina H₂ (PGH₂, *siglas en inglés*) y el factor activador de plaquetas (PAF, *siglas en inglés*) (**Ilustración 14**) (Cahill & Redmond 2016; Shimokawa et al. 1996).

Ilustración 14. Factores que regulan el tono vascular producido por el endotelio.



En este sentido, la DE comprende un desequilibrio entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores endoteliales, donde el estado vasoconstrictor se convierte en dominante. La DE está comúnmente asociada a una reducida biodisponibilidad del NO. En consecuencia,

el endotelio muestra una incapacidad para iniciar la vasodilatación en respuesta a diferentes estímulos. Esto convierte al NO en una de las moléculas más importantes que sintetiza el endotelio vascular al actuar como un potente vasodilatador, entre otras funciones (Cahill & Redmond 2016).

El efecto vasodilatador del NO se produce cuando, de forma paracrina, induce la relajación del músculo liso vascular próximo. En los seres humanos se produce una liberación endotelial continua de NO, que contribuye a mantener el tono arterial de reposo en la circulación pulmonar y sistémica. La fuerza de cizallamiento tangencial sobre el endotelio, aparte de diversos estímulos químicos, es un factor activador clave de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, *siglas en inglés*), en circunstancias fisiológicas. En consecuencia, esta fuerza de cizallamiento aumenta la liberación del NO y facilita la adaptación de la perfusión de los órganos a los cambios del gasto cardíaco.

La disminución de la biodisponibilidad del NO puede deberse a la reducción en la producción de NO por la eNOS, al aumento de la degradación del NO por las especies reactivas de oxígeno (EROs) o a ambas (Arrebola-Moreno et al. 2012). Desde estadios iniciales de la DE se puede observar la disminución de la biodisponibilidad del NO, caracterizando la alteración de la vasorelajación dependiente del endotelio. Este hecho constituye uno de los fenómenos más tempranos y de mayor importancia en la DE (Davignon & Ganz 2004). En consecuencia, el término DE se ha convertido en sinónimo de reducida biodisponibilidad del NO (Cahill & Redmond 2016).

Diversos FRCV están relacionados con la DE al producir, entre otros eventos, una menor biodisponibilidad del NO en la pared arterial (Montezano & Touyz 2012; Yetik-Anacak & Catravas 2006). Este hecho es promovido fundamentalmente por la presencia de EO. La biodisponibilidad del NO puede ser restaurada a través de medidas como la ingesta de antioxidantes o L-arginina (su precursor natural) (Suganya et al. 2016; Yetik-Anacak & Catravas 2006).

La importancia del NO es debida, además de por su acción como potente vasodilatador, por llevar a cabo otras importantes acciones en el endotelio vascular. A este respecto, destaca su papel como inhibidor de la adhesión e infiltración de células inflamatorias, de la proliferación y migración de CMLVs, de la agregación plaquetaria, y de la formación de trombos. Además, el NO previene la oxidación de las cLDL evitando, en general, la presencia de EO a nivel vascular (Cahill & Redmond 2016; Montezano & Touyz 2012; Davignon & Ganz

2004; Egashira 2002; Britten et al. 1999). Por todo esto, el NO inhibe procesos proaterogénicos y estimula procesos antiaterogénicos (Cahill & Redmond 2016; Davignon & Ganz 2004).

También es importante destacar que la disminución de la biodisponibilidad del NO promueve la denudación del endotelio vascular, debido a un aumento en la apoptosis de las CEs (Dimmeler & Zeiher 1999). Este daño endotelial se intenta reparar mediante la proliferación de las propias CEs y por diversos mecanismos llevados a cabo por células derivadas de la médula ósea denominadas células progenitoras endoteliales (CPEs) (Li et al. 2012; Szmitko, Fedak, et al. 2003). Las CPEs poseen la capacidad de proliferar y diferenciarse en CEs maduras *in situ*, mediante un proceso denominado vasculogénesis postnatal. Este proceso se realiza en puntos de neovascularización y reendotelialización. Las CPEs poseen además, un efecto paracrino que promueve el crecimiento vascular mediante la secreción de factores angiogénicos (Urbich & Dimmeler 2004). Esta reendotelización del endotelio lesionado en estadios avanzados con ECV establecida no se realiza eficazmente (Everaert et al. 2010; Walter et al. 2005; Heeschen et al. 2004), incrementándose así el riesgo de eventos CV.

Por otro lado, en la DE también se produce la expresión de moléculas de adhesión a nivel vascular, las cuales juegan un papel fundamental en las interacciones entre leucocitos, plaquetas y endotelio (Nakashima et al. 1998). Los leucocitos del torrente sanguíneo se adhieren a la superficie del endotelio disfuncional mediante estas moléculas de adhesión no expresadas en las CEs normales. Además, estas moléculas facilitan, junto con las quimioquinas, la trans migración de las células inflamatorias a través del endotelio vascular al espacio subendotelial (Libby et al. 2010). Esto promueve fenómenos inflamatorios locales que ponen en marcha la formación de la placa de ateroma (Libby 2012; Szmitko, Wang, Weisel, de Almeida, et al. 2003; Szmitko, Wang, Weisel, Jeffries, et al. 2003; Libby 2002). Estas moléculas de adhesión, cuando se encuentran circulando en el plasma, han sido utilizadas por diversos estudios como potenciales biomarcadores de Aterosclerosis (Kocijancic et al. 2016; Rohde et al. 1998; Hwang et al. 1997) y de DE (Thompson et al. 2011; Khaleghi et al. 2008).

Cuando los monocitos se encuentran dentro de la íntima arterial maduran a macrófagos y comienzan a expresar receptores *scavenger*, los cuales facilitan la captación e internalización de las cLDLox (Ruberg & Loscalzo 2005; Kunjathoor et al. 2002). La internalización de estas cLDLox da lugar a macrófagos cargados de lípidos o células

espumosas que caracterizan las lesiones ateroscleróticas tempranas (Szmitko, Wang, Weisel, de Almeida, et al. 2003). Dentro del ateroma en desarrollo, las células espumosas comienzan a sintetizar más citoquinas proinflamatorias que mantienen un estímulo quimiotáctico para los leucocitos adherentes, aumentan la expresión de receptores *scavenger* y promueven la replicación de macrófagos (Ruberg & Loscalzo 2005; Libby 2002). La muerte de las células espumosas conduce a la formación del "núcleo necrótico" concebido como un depósito de desechos celulares y lípidos (Libby 2012).

La DE también estimula la adhesión y la activación de las plaquetas en la pared vascular. No siendo necesario, como requisito previo, la denudación del endotelio (Massberg et al. 2004; Massberg et al. 2002). Estos eventos son los pasos iniciales que conducen a la trombosis arterial y a la oclusión vascular (Massberg et al. 2004).

En este aspecto, se ha postulado que los mecanismos moleculares implicados en la activación plaquetaria en las etapas iniciales de la lesión aterosclerótica son: 1) la reducción de los mecanismos del endotelio implicados en el mantenimiento de las propiedades antitrombóticas, 2) la generación elevada de EROs provocada por diversas alteraciones (HTA, diabetes, dislipemias, hábito tabáquico, etc.) y 3) el aumento de mediadores protrombóticos y proinflamatorios tanto circulantes como presentes en el endotelio (Huo & Ley 2004).

En la lesión endotelial también se ven promovidas la remodelación vascular y la formación de la capa fibrosa. Esto es debido a que en presencia de DE, las CMLVs migran a la capa íntima atraídas por agentes quimiotácticos y sufren cambios fenotípicos bajo el estímulo de diversos factores aterogénicos. Esto último conlleva su desdiferenciación y la adquisición un fenotipo sintético. Así, las CMLVs pasan de un fenotipo contráctil no proliferativo, típico de arterias sanas, a un fenotipo proliferativo y sintético que produce componentes de la matriz extracelular que pueden dar lugar a la capa fibrosa (Badimón et al. 2009). Posteriormente, se lleva a cabo una sobresecreción, por parte de los macrófagos, de colagenasas intersticiales pertenecientes a la familia de las MMPs. Esto es inducido por la presencia de diversas citoquinas proinflamatorias en el área vascular afectada y pone en peligro la estabilidad biomecánica de la capa fibrosa protectora de la placa, predisponiendo así a su ruptura y a la génesis de trombosis (Libby 2012; Galis et al. 1994).

Estos complejos mecanismos presentes en la DE dan lugar a la formación de la placa de ateroma, su progresión y complicación (Cahill & Redmond 2016; Gutiérrez et al. 2013; Ribeiro et al. 2009; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001).

1.4.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

La evaluación de la función endotelial ha surgido, desde hace años, como una herramienta pronóstica para predecir el desarrollo de la Aterosclerosis. En este sentido, el estudio de la función endotelial en la investigación clínica se considera un punto clave en la evaluación del RCV (Cahill & Redmond 2016; Shechter et al. 2014; Xu et al. 2014; Ras et al. 2013; Gutiérrez et al. 2013; Shechter et al. 2009; Yeboah et al. 2009; Bonetti et al. 2003; Kuvín et al. 2001). Esto es debido a su importante papel en todo el proceso aterosclerótico, a su carácter reversible y a la existencia de herramientas diagnósticas para su evaluación (Bonetti et al. 2003; Verma et al. 2003).

Entre las herramientas diagnósticas empleadas para evaluar la función endotelial destacan las técnicas de imagen, entre las que se encuentran la resonancia magnética (RM), la tomografía de emisión de positrones, la tomografía computarizada (TC), la TC por emisión monofotónica, la vasodilatación mediada por flujo (DMF) medida mediante ecografía arterial, el análisis de la onda del pulso y la pletismografía digital durante la hiperemia postisquémica arterial, etc. En la actualidad, la DMF es el método más comúnmente utilizado para su evaluación, principalmente por su sensibilidad y carácter no invasivo (**Ilustración 15**) (Arrebola-Moreno et al. 2012; Charakida et al. 2010). Esta prueba se basa en la liberación endotelial de NO y otros factores relajantes derivados del endotelio, en respuesta a un aumento de la fuerza de cizallamiento tangencial.

Ilustración 15. Evaluación de la función endotelial mediante la vasodilatación mediada por flujo (DMF) de una arteria.

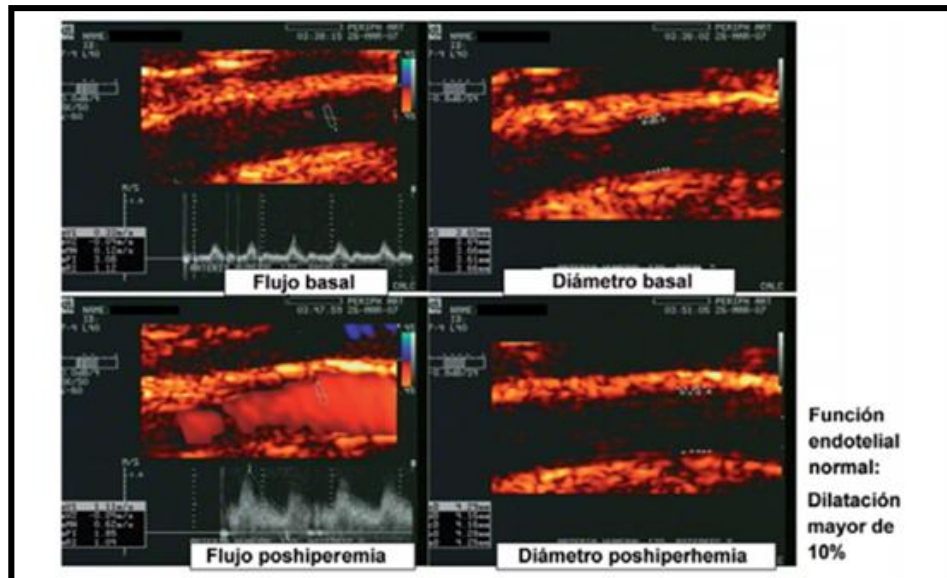


Imagen extraída de Manfredi Carabetti JA., 2012.

La DMF ha demostrado tener valor pronóstico de eventos CV futuros, tanto en sujetos sintomáticos con ECV establecida (Xu et al. 2014; Ras et al. 2013) como en sujetos asintomáticos o aparentemente sanos (Shechter et al. 2014; Shechter et al. 2009; Corrado et al. 2008). En estos últimos resulta especialmente importante, ya que se estima que un alto porcentaje de estos sujetos padecen enfermedad aterosclerótica (Ray et al. 2015). Por ello, su detección es una prioridad para la prevención primaria CV al ser considerados de alto RCV (Lobos et al. 2008; Ian Graham et al. 2007).

1.4.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y OTROS FRCV

La relación existente entre la DE y los FRCV tradicionales se ha observado en múltiples estudios (Cantalupo et al. 2015; Vanhoutte 2009; Thuillez & Richard 2005; Modena et al. 2002; Perticone et al. 2001; Panza et al. 1990; Shi & Vanhoutte 2017; Sena et al. 2013; Osto et al. 2008; Maas et al. 2008; Casino et al. 1994; Creager et al. 1990; Ciccone et al. 2013; Ryliskyte et al. 2004; Barton et al. 2012; Campia et al. 2012; Meyers & Gokce 2007; Ambrose & Barua 2004; Puranik & Celermajer 2003). Esto se puede ver en el vínculo mantenido con la HTA (Cantalupo et al. 2015; Vanhoutte 2009; Thuillez & Richard 2005; Modena et al. 2002; Perticone et al. 2001; Panza et al. 1990), la diabetes mellitus (Shi & Vanhoutte 2017; Sena et al. 2013), las dislipemias (Osto et al. 2008; Maas et al. 2008; Casino et al. 1994;

Creager et al. 1990), la edad avanzada (Ciccone et al. 2013; Ryliskyte et al. 2004), la obesidad (Barton et al. 2012; Campia et al. 2012; Meyers & Gokce 2007) o el hábito tabáquico (Ambrose & Barua 2004; Puranik & Celermajer 2003).

La DE también se ha asociado con estadios intermedios como la preHTA (Kissel & Anderson 2012; Giannotti et al. 2010), la prediabetes o glucemia alterada (Nwose et al. 2014), el sobrepeso (Patel et al. 2009; Van Guilder et al. 2005; Brook et al. 2001; Brook et al. 2004) o la edad media (Ciccone et al. 2013).

Aunado a esto, la DE ha sido relacionada con FRCV emergentes como los niveles circulantes elevados de cLDLox (Gradinaru et al. 2015; Valls et al. 2015).

En lo que respecta a la presión arterial, es bien conocido como la **preHTA** (Lehmann et al. 2016; Huang et al. 2014; Guo et al. 2013; Wang et al. 2013; Huang et al. 2013; Lewington et al. 2002) y la **HTA** (WHO 2002; WHO/ISH 2003; WHO/ISH 2004) incrementan la morbimortalidad CV. La DE está asociada tanto a la preHTA (Kissel & Anderson 2012; Giannotti et al. 2010) como a la HTA (Cantalupo et al. 2015), siendo la DE un evento temprano que contribuye a la desregulación del tono vascular (Vanhoutte 1996; Taddei & Salvetti 1996; Taddei et al. 1996). En este sentido, la DE podría ser la predecesora del desarrollo de la presión arterial elevada y participar en su patogenia (Bautista 2003). Además, la DE es un predictor de eventos CV en sujetos con HTA (Modena et al. 2002; Perticone et al. 2001). Referente a lo cual, algunos autores alegan cómo la mejora de la función endotelial proporciona un mejor pronóstico frente a los eventos CV en sujetos hipertensos, de forma independiente, a los FRCV tradicionales incluida la presión arterial (Modena et al. 2002).

Entre los mecanismos subyacentes involucrados en esta asociación se encuentra la liberación anormal, por parte de las CEs, de factores vasodilatadores y vasoconstrictores. Este hecho hace que se promueva un desequilibrio a favor de la contracción vascular, al disminuir la biodisponibilidad del NO y aumentar la producción de factores vasoconstrictores como la ET-1, ANG II, TXA2, etc. (Kissel & Anderson 2012; Versari et al. 2009; Tang & Vanhoutte 2010). Esto es causado, entre otras razones, por un incremento en los niveles de EROs (Versari et al. 2009).

Otros mecanismos involucrados son la alteración de la biosíntesis autocrina de esfingolípidos endoteliales, la cual es crítica para la función vascular y la homeostasis de la

presión arterial (Cantalupo et al. 2015); una menor capacidad de reparar el endotelio vascular lesionado por parte de las CPEs (Giannotti et al. 2010); y una disminución de la activación de la eNOS dependiente de la proteína quinasa B (PKB, *siglas en inglés*) (Iaccarino et al. 2004).

La **diabetes** y la **prediabetes** son FRCV ateroscleróticos que están fuertemente asociados con la DE (Nwose et al. 2014; Potenza et al. 2009). Esta relación se debe fundamentalmente a la toxicidad provocada por la hiperglucemia (Nwose et al. 2014).

La hiperglucemia produce glicación de diversas moléculas intracelulares y extracelulares, lo que conduce a la formación de AGEs. Los AGEs se acumulan en la pared vascular y reducen la biodisponibilidad del NO (Avogaro et al. 2008; Soldatos et al. 2005). Además, estas moléculas al unirse a sus receptores de superficie específicos expresados en diversas células vasculares, producen la amplificación de la respuesta inflamatoria (Avogaro et al. 2008; Soldatos et al. 2005), el aumento de la permeabilidad y la promoción de la presencia de EO a nivel vascular (Soldatos et al. 2005).

Asimismo, la hiperglucemia activa la proteína quinasa C (PKC, *siglas en inglés*), una importante enzima que participa en la relación establecida entre la diabetes y la DE (Naruse et al. 2006). Esto se debe a que su activación produce la disminución de la actividad de la eNOS (disminución de NO) e incrementa la producción de ET-1, conduciendo al predominio de la vasoconstricción (Avogaro et al. 2008). La PKC también incrementa la expresión de moléculas de adhesión asociadas a la DE (Avogaro et al. 2008).

La DE en los sujetos diabéticos es principalmente atribuible a la presencia de EO. En este sentido, se ha observado que los sujetos diabéticos tienen una mayor formación de AGEs y de RL, como el superóxido (O_2^-). Esto causa, entre otros efectos, la disminución de la biodisponibilidad de NO (Avogaro et al. 2008; Guzik et al. 2002). Además, en la diabetes también se ve incrementada la producción de prostanoides vasoconstrictores (Vanhoutte 2009).

La DE en la diabetes es un factor crítico e iniciador de la génesis de las complicaciones vasculares en esta patología (Shi & Vanhoutte 2017). La DE en las complicaciones macrovasculares diabéticas se caracteriza por una biodisponibilidad reducida del NO poco compensada por otros factores vasodilatadores y por un aumento de la acción de los vasoconstrictores derivados del endotelio. Mientras que en las complicaciones

microvasculares diabéticas, la DE se debe fundamentalmente a una disminución en la liberación del NO, una mayor presencia de EO, un incremento en la producción de factores inflamatorios, una angiogénesis anormal y un deterioro en la reparación endotelial (Shi & Vanhoutte 2017).

Por otra parte, la **hiperlipidemia** constituye un aumento de los lípidos circulantes en el torrente sanguíneo que predispone al desarrollo de la DE. Los posibles mecanismos por los cuales la hiperlipidemia induce DE son, por una parte, la sobreexpresión de la enzima nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidasa (NADPH oxidase, *siglas en inglés*), la activación de la c-Jun N-terminal quinasa 2 (JNK2, *siglas en inglés*) (Osto et al. 2008), y el incremento de la producción del O_2^- (Warnholtz et al. 2001) y de otras EROs (Vasconcelos et al. 2009), que dan lugar a la presencia de EO (Osto et al. 2008). Y por otro lado, se encuentra el aumento de los niveles plasmáticos de dimetilarginina asimétrica (ADMA, *siglas en inglés*) (Böger et al. 2004; Böger et al. 2003) y la oxidación de las cLDL (Vasconcelos et al. 2009).

Asimismo, el **sobrepeso y la obesidad** son importantes FRCV ateroscleróticos que están relacionados con la DE (Suboc et al. 2013; Campia et al. 2012; Thompson et al. 2011; Patel et al. 2009; Van Guilder et al. 2005). Esta asociación se establece al producir, tanto el sobrepeso como la obesidad, un daño endotelial a través de una mayor síntesis de adipoquinas proaterogénicas y una menor síntesis de adipoquinas antiaterogénicas. En este sentido, el tejido adiposo blanco es reconocido, desde hace décadas, como un órgano endocrino activo y fuente de multitud de factores bioactivos categorizados como adipoquinas. Las adipoquinas incluyen un gran número de citoquinas (ej. TNF- α e IL 6), quimioquinas (ej. IL-8 y MCP-1) y hormonas (ej. leptina, resistina y adiponectina) (Zhang et al. 2010). En estados de sobrepeso u obesidad se ve alterada esta síntesis de factores bioactivos al aumentar la cantidad sintetizada de adipoquinas proaterogénicas (leptina, resistina, TNF- α , IL 6 y MCP-1) y disminuir la de adipoquinas antiaterogénicas (adiponectina). Este desequilibrio pone en marcha diversos mecanismos directos e indirectos que promocionan la DE (Huby et al. 2015; Zhang et al. 2010; Knudson et al. 2007; Chudek & Wiecek 2006; Vecchione et al. 2002).

A esto hay que añadir que el sobrepeso y la obesidad suelen estar asociados con trastornos como la dislipemia, la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, los niveles circulantes elevados de cLDLox, y/o la presión arterial elevada, que favorecen la génesis de la DE. La adiposidad excesiva también se encuentra vinculada a la presencia de EO y ambiente

proinflamatorio a nivel vascular, además de a una menor biodisponibilidad del NO (Zhang et al. 2010; Barton et al. 2012; Campia et al. 2012; Meyers & Gokce 2007; Raitakari et al. 2004; Brook et al. 2001; Knudson et al. 2007).

El **avance de la edad** también se encuentra asociado con la DE (Herrera et al. 2010) (Katusic 2007). Esto es debido a que el envejecimiento produce alteraciones estructurales y funcionales en el vaso sanguíneo de forma independiente a otros factores. En este sentido, la edad *per se* es un predictor de la DE (Ciccone et al. 2013; Ryliskyte et al. 2004). La degeneración de la función endotelial con la edad se empieza a observar en los hombres a partir de los 40 años y en las mujeres una vez instaurada la menopausia (Ciccone et al. 2013). Por esta razón, la edad debe ser tenida en cuenta durante la evaluación clínica para poder detectar a los sujetos en posible proceso aterosclerótico, aunque presenten pronóstico de bajo RCV emitido mediante la valoración de FRCV tradicionales (Ciccone et al. 2013; Ryliskyte et al. 2004).

Uno de los mecanismos subyacentes por los cuales el avance de los años produce DE, es una menor biodisponibilidad del NO debido a una menor capacidad del endotelio para producirlo (Herrera et al. 2010), a una mayor actividad de la arginasa I (ARG I) (Katusic 2007) y a un incremento en los niveles plasmáticos de ADMA (Riccioni et al. 2014). Este último es un inhibidor endógeno de la enzima eNOS que compite con la L-arginina y que por tanto, disminuye la biodisponibilidad del NO (Fabian et al. 2012). Otros mecanismos existentes son la reducción de la síntesis de otros factores vasodilatadores endoteliales (PGI₂ y EDHF) y el aumento de la producción de vasoconstrictores como la ET-1 y los prostanoïdes derivados de la enzima ciclooxigenasa (COX) (Herrera et al. 2010).

Respecto a la **exposición al humo de tabaco**, ya sea de forma activa (hábito tabáquico) (Karatzi et al. 2007; Puranik & Celermajer 2003) o pasiva (Barnoya & Glantz 2005; Otsuka et al. 2001), se encuentra relacionada con la génesis de la DE. Esta asociación se ve intensificada en los fumadores crónicos (Karatzi et al. 2007). La causa de esto es que los efectos nocivos del tabaquismo sobre el endotelio vascular son dependientes de la dosis, pudiendo ser reversibles si el sujeto deja de exponerse al humo del tabaco (Karatzi et al. 2007; Puranik & Celermajer 2003). El tabaquismo, al igual que otros FRCV, parece mediar su daño endotelial principalmente a través de la generación de EO. El motivo de esto es que el hábito tabáquico aumenta la producción de EROs y RL de forma endógena (activación de células inflamatorias) y exógena (humo del cigarrillo es rico en RL) (Grassi et al. 2010; Antoniadis et al. 2008; Burke & Fitzgerald 2003; Puranik & Celermajer 2003). Así, el

tabaquismo produce en el organismo, entre otros efectos deletéreos, una disminución en la biodisponibilidad del NO (Grassi et al. 2010; Burke & Fitzgerald 2003), una disminución en los niveles de antioxidantes, un aumento en los niveles de peroxidación lipídica (incluyendo los niveles de cLDLox) y una disminución en los niveles de cHDL (Puranik & Celermajer 2003).

Por otra parte, es bien conocida la relación entre los **niveles elevados de cLDLox** y la DE (Bottino et al. 2015; Gradinaru et al. 2015; Ma et al. 2006; Matsumoto et al. 2004). Entre los mecanismos existentes por los cuales las cLDLox promocionan la DE se encuentran por una parte, la estimulación de la adhesión de monocitos a las CEs (Cominacini et al. 1997; Rosenfeld et al. 1990; Quinn et al. 1988), así como la de su migración, activación, proliferación y transformación a macrófagos en la capa íntima arterial (Cahill & Redmond 2016; Maiolino et al. 2013; Yui et al. 1993); la promoción de la transformación de los macrófagos a células espumosas (Pirillo et al. 2013; Aviram 1996); y la estimulación de la migración y proliferación de las CMLVs (Pirillo et al. 2013; Maiolino et al. 2013).

Y por otro lado, están mecanismos como la inducción a la apoptosis de diversas células entre las que se encuentra las CEs (Valente et al. 2014; Maiolino et al. 2013; Norata et al. 2002; Sata & Walsh 1998), y el empeoramiento de la adhesión y funcionalidad de las CPEs en el endotelio vascular, además de disminuir su supervivencia (Ma et al. 2006). A lo que hay que unir la promoción de una expresión génica proinflamatoria (Yurdagul et al. 2014; Zhang & Wu 2013) y la estimulación de la vasoconstricción. Esta cadena de acontecimientos provoca el daño endotelial y amplifica la respuesta proaterogénica dentro de la pared del vaso sanguíneo (Maiolino et al. 2013; Pirillo et al. 2013; Trpkovic et al. 2015; Burgos Alves et al. 2010).

1.5. NIVELES CIRCULANTES ELEVADOS DE cLDLox

El EO se presenta cuando la producción de las especies reactivas, principalmente de oxígeno (EROs), no puede ser paliada por la capacidad antioxidante del organismo, produciéndose un desequilibrio a favor de las moléculas prooxidantes en detrimento de las defensas antioxidantes (Montuschi et al. 2007).

El equilibrio en el balance oxidativo del organismo es esencial para llevar a cabo procesos básicos como la regulación metabólica, la producción de energía, y la activación o inactivación de biomoléculas. También es importante en la transducción de señales, en el

recambio celular y en el control del tono vascular, entre otros (Dianzani 1992). La presencia de EO, además de alterar dichos procesos, puede producir daños celulares por la alteración de diversas biomoléculas (Sies 1991). Esta situación es característica de diferentes patologías y del propio proceso de envejecimiento (Höhn et al. 2017; Lee et al. 2017; Schrag et al. 2013; Strobel et al. 2011).

El EO juega un papel clave en el desarrollo de multitud de ECV, entre las que se encuentra la Aterosclerosis (**Ilustración 16**) (Dinh et al. 2016; Di Minno et al. 2016; Trpkovic et al. 2015; Strobel et al. 2011; Victor et al. 2009; Bonomini et al. 2008; Thomson et al. 2007; Stocker & Keaney 2004). En este sentido, cabe destacar que el EO es un estado fisiopatológico de gran importancia en el desarrollo del proceso aterosclerótico (Dinh et al. 2016; Di Minno et al. 2016; Trpkovic et al. 2015; Strobel et al. 2011; Victor et al. 2009; Bonomini et al. 2008; Thomson et al. 2007; Stocker & Keaney 2004).

Ilustración 16. Estrés oxidativo y diversas ECV.

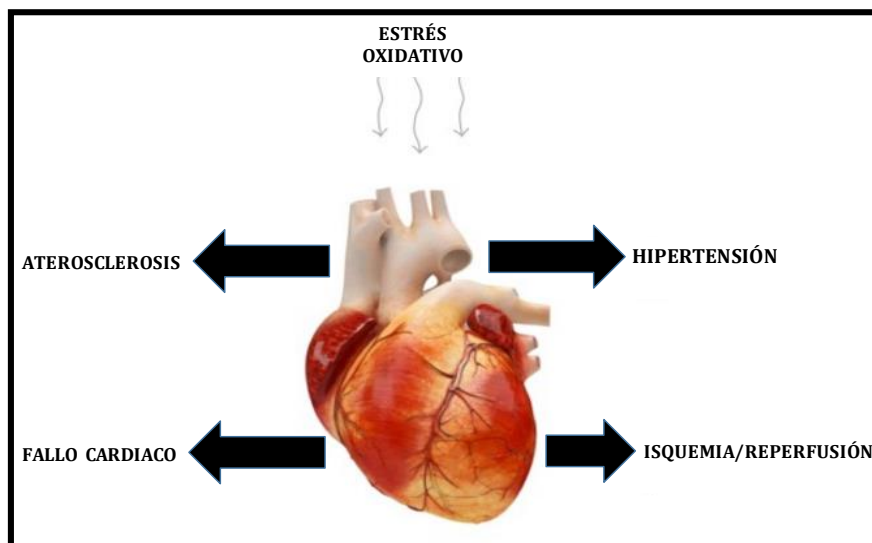


Imagen modificada de Skibska and Goraca, 2015.

Una de las moléculas más sensibles a la acción oxidante de las EROs son las lipoproteínas cLDL. Cuando las cLDL se oxidan y dan lugar a las cLDLox, se produce una de las moléculas más importantes en el proceso aterogénico (Trpkovic et al. 2015). Incluso se le ha dado tanta importancia a su participación, que se ha creado en torno suyo una de las principales hipótesis que explican el complejo proceso de la Aterosclerosis (**Ilustración 17**) (Stocker & Keaney 2004; Chisolm & Steinberg 2000; Bhakdi 1998; Steinberg et al. 1989).

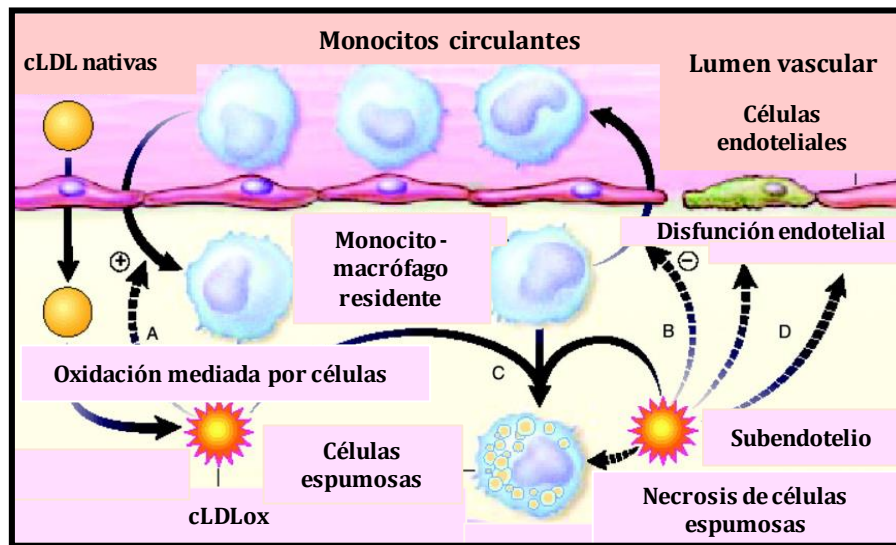
Ilustración 17. Hipótesis de la Aterosclerosis "Modificación Oxidativa".

Imagen modificada de Stocker and Keaney, 2004.

A este respecto, es importante señalar que la evaluación de los niveles circulantes de cLDLox ha sido uno de los biomarcadores de EO más empleado en los estudios de investigación sobre el proceso aterosclerótico (Strobel et al. 2011). En este sentido, diferentes estudios han puesto de manifiesto cómo su valoración puede ser clave para el diagnóstico y pronóstico de la Aterosclerosis (Trpkovic et al. 2015; Itabe 2003; Huang et al. 2012; Ehara et al. 2001; Tsutsui et al. 2002; Meisinger et al. 2005). Esto es en parte debido a que muestra una mayor sensibilidad y especificidad que FRCV tradicionales para detectar a los sujetos con enfermedad arterial (Holvoet et al. 2001).

Asimismo, las cLDLox contribuyen de forma determinante al desarrollo de la Aterosclerosis al promover tanto la formación de la placa aterosclerótica (H. Chen et al. 2008; Holvoet et al. 2007) como su progresión (Huang et al. 2012; Koenig et al. 2011; Toshima et al. 2000) y posterior desestabilización (Sigala et al. 2010; Uno, Kitazato, et al. 2005; Tsutsui et al. 2002; Nishi et al. 2002; Ehara et al. 2001; Yamashita et al. 2007).

Esta acción proaterogénica la llevan a cabo mediante diversos mecanismos, entre los que destacan la activación endotelial y la promoción de la DE (Gradinaru et al. 2015; Ma et al. 2006; Matsumoto et al. 2004; Bottino et al. 2015; Pirillo et al. 2013). Otros mecanismos subyacentes son la estimulación de la adhesión de monocitos a las CEs (Rosenfeld et al. 1990; Quinn et al. 1988), además de promover su migración, activación y transformación a

macrófagos en la capa íntima arterial (Cahill & Redmond 2016; Maiolino et al. 2013; Yui et al. 1993).

También favorecen la captura en la íntima de los monocitos y los macrófagos (Maiolino et al. 2013; Quinn et al. 1987), la transformación de los macrófagos a células espumosas (Maiolino et al. 2013), y la adhesión y agregación plaquetaria mediante la disminución de la producción endotelial del NO y el aumento de la producción de la PGI₂ (Li et al. 1998; Thorin et al. 1994; Armstrong 1992).

Además, las cLDLox estimulan la migración y proliferación de CMLVs en la capa íntima, mediante una mayor síntesis de factores de crecimiento producidos por las CE y los macrófagos (Cahill & Redmond 2016; Maiolino et al. 2013; Lindner et al. 1991; Kohno et al. 1998; Stiko-Rahm et al. 1992). A lo que hay que añadir la promoción de una mayor producción de colágeno por parte de las CMLVs, que favorece la formación de la cápsula fibrosa y amplifica la lesión aterosclerótica (Jimi et al. 1995).

Aunque por otra parte, las cLDLox promueven el adelgazamiento de esta cápsula al estimular una mayor secreción de las MMP 1 y 9 (Xu et al. 1999; Rajavashisth et al. 1998). A causa de lo cual inducen la creación de placas vulnerables (Stone et al. 2011; Virmani et al. 2000).

Otras acciones indeseables producidas por las cLDLox son la promoción de la apoptosis de las CE, CMLVs, fibroblastos, monocitos, macrófagos y células espumosas, con la consiguiente liberación en el espacio subendotelial de lípidos y de enzimas lisosomales. Este hecho da lugar a la formación del “núcleo necrótico” en el proceso aterosclerótico (Valente et al. 2014; Maiolino et al. 2013; Loidl et al. 2004; Norata et al. 2002; Sata & Walsh 1998; Hardwick et al. 1996; Schwartz et al. 1991; Cathcart et al. 1985).

Más acciones deletéreas de las cLDLox son la inducción a la apoptosis de las CPEs y el empeoramiento de su adhesión y funcionalidad en el endotelio vascular (Ma et al. 2006); además de producir cambios epigenéticos que promocionan un ambiente proinflamatorio (Zhang & Wu 2013).

Por si esto fuera poco, las cLDLox han sido relacionadas con una disminución en la secreción del activador tisular del plasminógeno (t-PA, *siglas en inglés*) y con un aumento en la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1, *siglas en inglés*), lo que produce una reducción de la actividad fibrinolítica del endotelio que favorece la trombosis (Allison et al. 1999; Gräfe et al. 1998; Armstrong 1992).

La promoción de la vasoconstricción mediante la disminución de la síntesis del NO (Pirillo et al. 2013; Liao et al. 1995), y el aumento de la producción de ET-1 (Pirillo et al. 2013; Boulanger et al. 1992) y de ANG II (Pirillo et al. 2013), son algunas de las consecuencias de los niveles de cLDLox elevados. En este sentido, se ha observado cómo los niveles circulantes de cLDLox determinan la respuesta micro y macrovasomotora de forma independiente a los FRCV (Matsumoto et al. 2004).

Estos mecanismos explican las acciones proinflamatorias, prooxidantes, proliferativas, proapoptóticas, protrombóticas, antifibrinolíticas y vasoconstrictoras de las cLDLox, lo que demuestra su efecto proaterogénico global y su gran importancia en todo el proceso aterosclerótico (Cahill & Redmond 2016; Le 2014; Maiolino et al. 2013; Pirillo et al. 2013; Xu et al. 2013; Ma et al. 2006).

En consecuencia, los niveles circulantes elevados de cLDLox están asociados con todas las etapas de la Aterosclerosis, desde la temprana aterogénesis, HTA, enfermedad arterial coronaria y periférica, hasta los síndromes coronarios agudos e infartos cerebrales isquémicos (Trpkovic et al. 2015). Por todo ello, los niveles de cLDLox circulantes son considerados un predictor de futuros eventos CV (Johnston et al. 2006b; Shimada et al. 2004; Salonen et al. 1992; Bayés et al. 2006; Shoji et al. 2002; Tsutsui et al. 2002; Erkkilä et al. 2005) tanto en sujetos sintomáticos de ECV (Ehara et al. 2008; Ehara et al. 2001; Tsutsui et al. 2002; Tsimikas et al. 2003; Shimada et al. 2004) como en sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos (Meisinger et al. 2005; Holvoet et al. 2004; Holvoet et al. 2003). En estos últimos es de gran utilidad, al estar asociados estos niveles con la fase silenciosa de la progresión de la placa aterosclerótica de forma independiente a los FRCV tradicionales (Wallenfeldt et al. 2004; Hulthe & Fagerberg 2002; Metso et al. 2004).

En conclusión, los niveles circulantes de cLDLox pueden ser uno de los biomarcadores más adecuados para detectar a los sujetos que padecen de enfermedad aterosclerótica (Huang et al. 2012; Johnston et al. 2006a; Holvoet et al. 2001; Suzuki et al. 2002; Faviou et al. 2005; Huang et al. 2008).

1.5.1. NIVELES CIRCULANTES ELEVADOS DE cLDLox Y OTROS FRCV

Los niveles circulantes elevados de cLDLox se encuentran asociados a los FRCV tradicionales, como la HTA (Guxens et al. 2009; Huang et al. 2008; Uzun et al. 2004; Frostegård et al. 2003), la diabetes mellitus (Favre et al. 2011; Rizzo et al. 2010; Njajou et

al. 2009; Huang et al. 2008; El-Bassiouni et al. 2007; Abderrahmani et al. 2007; Hoogeveen et al. 2007; De Castro et al. 2005), las dislipemias (Harmon et al. 2016; Ramos-Arellano et al. 2014; Holvoet et al. 2003; Sigurdardottir et al. 2002), la obesidad (Ramos-Arellano et al. 2014; Njajou et al. 2009; Weinbrenner et al. 2006; Sigurdardottir et al. 2002), la edad avanzada (Paik et al. 2013; Fabian et al. 2012; Donato et al. 2008) o el hábito tabáquico (Ogawa et al. 2015; Kassi et al. 2009; Bloomer 2007).

También, como se ha mencionado anteriormente, se encuentran relacionados con FRCV emergentes como la DE (Gradinaru et al. 2015; Zhai et al. 2015; Cao et al. 2013; Plant et al. 2008; Li & Mehta 2003; Penn & Chisolm 1994). Además de estar vinculados con estadios intermedios como la preHTA (Côté et al. 2010; Chrysohoou et al. 2007; Toikka et al. 2002; Toikka et al. 2000), la prediabetes (Graessler et al. 2007; Kopprasch et al. 2003; Kopprasch et al. 2002), el sobrepeso (Kassi et al. 2009; Weinbrenner et al. 2006) o la edad media (Paik et al. 2013).

En este sentido, se ha observado cómo los sujetos con **preHTA** presentan elevados niveles de cLDLox circulantes en comparación con los sujetos normotensos (Côté et al. 2010; Chrysohoou et al. 2007; Toikka et al. 2002; Toikka et al. 2000). Esto se puede ver en grandes estudios como el estudio ATTICA, donde se obtuvo una asociación directa entre los niveles de cLDLox y la PAS y la PAD en sujetos con preHTA sin ECV establecida. En este estudio, los sujetos con preHTA presentaban niveles de cLDLox 15% superiores a los que presentaban los sujetos con normotensión (Chrysohoou et al. 2007). Esto podría estar relacionado con el hecho de que los sujetos con preHTA posean una menor elasticidad vascular (Toikka et al. 2002) y un mayor grosor de la íntima-media arterial (Toikka et al. 2000), ya que ambos factores están íntimamente relacionados con los niveles de cLDLox (Toikka et al. 2002; Toikka et al. 2000). Asimismo, el incremento de estos niveles en sujetos con preHTA puede estar asociado a una mayor expresión de TNF- α (Côté et al. 2010), citoquina que desempeña importantes funciones en el proceso de formación de la placa aterogénica.

En sujetos con **HTA** también se ha observado un incremento en los niveles circulantes de cLDLox (Guxens et al. 2009; Huang et al. 2008; Uzun et al. 2004; Frostegård et al. 2003). Además, dichos niveles se ven incrementados a medida que aumentan los valores de la HTA (Guxens et al. 2009). Este hecho parece estar asociado con una disminución de la actividad de la enzima paraoxonasa 1 (PON-1) en estos sujetos (Uzun et al. 2004), la cual juega un papel importante en la prevención de la oxidación lipídica de las cLDL.

Por otra parte, la **prediabetes** se relaciona con la presencia de niveles circulantes elevados de cLDLox (Gokulakrishnan et al. 2007; Graessler et al. 2007; Kopprasch et al. 2003; Kopprasch et al. 2002), principalmente por la existencia de dislipemias en estos sujetos (Kopprasch et al. 2002). Asimismo, se ha observado que los sujetos con **diabetes de tipo I** también presentan cifras superiores de cLDLox (Lopes-Virella et al. 2011; Wegner et al. 2010; Kara et al. 2008; De Castro et al. 2005), las cuales están fuertemente asociadas con los niveles elevados de glucosa postprandial (De Castro et al. 2005).

Los sujetos con **resistencia a la insulina o diabetes de tipo II** también presentan niveles elevados de cLDLox (Kelly et al. 2010; Njajou et al. 2009; Park et al. 2009; Gokulakrishnan et al. 2007; Hoogeveen et al. 2007; Tsuzura et al. 2004). Este hecho probablemente sea debido a una menor actividad de PON-1 (Tsuzura et al. 2004) y a una disminución en los niveles circulantes de adiponectina (Lautamäki et al. 2007).

A esto hay que añadir que los niveles circulantes de cLDLox han sido asociados directamente con la duración de la diabetes de tipo I (Lopes-Virella et al. 2011) y tipo II (Nakhjavani et al. 2010). A tenor de esto, es importante señalar que los sujetos que padecen diabetes desde hace más de 5 años presentan un dramático aumento de los niveles de cLDLox, comparado con aquellos sujetos recién diagnosticados (Nakhjavani et al. 2010).

En este aspecto, también destaca el vínculo existente entre los niveles de cLDLox y la progresión y extensión de las complicaciones vasculares en los sujetos con diabetes tanto de tipo I (Hunt et al. 2013; Wegner et al. 2012; Lopes-Virella et al. 2011) como de tipo II (El-Bassiouni et al. 2007). Referente a lo cual se ha observado que los niveles circulantes de cLDLox podrían servir como un predictor de futuros eventos CV, cuando estos sujetos padecen además enfermedad aterosclerótica (El-Bassiouni et al. 2007).

Asimismo, los sujetos con **dislipemia** también presentan mayores niveles de cLDLox que los sujetos sin esta patología (Harmon et al. 2016; Ramos-Arellano et al. 2014; Holvoet et al. 2003; Sigurdardottir et al. 2002). Conforme a este vínculo, se ha observado que los niveles de lípidos son fuertes predictores de los niveles circulantes de cLDLox (Ramos-Arellano et al. 2014; Holvoet et al. 2003; Kopprasch et al. 2002). En este sentido, destaca la correlación inversamente proporcional existente entre los niveles de cLDLox y el tamaño de las cLDL (Sigurdardottir et al. 2002). En las dimensiones de las cLDL influyen factores como los niveles de adiponectina o la cantidad de tejido adiposo que presentan los sujetos (Hulthe et al. 2003).

El tejido adiposo parece mantener una asociación directa con los niveles circulantes de cLDLox (Trpkovic et al. 2015; Kelly et al. 2010; Njajou et al. 2009; Kassi et al. 2009; Weinbrenner et al. 2006). Observándose tanto en sujetos con sobrepeso (M. Kim et al. 2013; Kassi et al. 2009; Weinbrenner et al. 2006) como con obesidad (Ramos-Arellano et al. 2014; Njajou et al. 2009; Weinbrenner et al. 2006; Sigurdardottir et al. 2002) niveles elevados de cLDLox. Esto es debido a que el aumento del tejido adiposo induce la presencia de EO a nivel local y sistémico (Savini et al. 2013; Fernández-Sánchez et al. 2011). En este aspecto, influye de manera importante el aumento del tejido adiposo visceral o la presencia de obesidad abdominal (Indulekha et al. 2011; Weinbrenner et al. 2006), debido, muy probablemente, a su coexistencia con trastornos metabólicos (M. Kim et al. 2013; Sigurdardottir et al. 2002).

Por otra parte, **la edad avanzada** generalmente incrementa la posibilidad de producirse EO en el organismo (Babizhayev et al. 2014; Fabian et al. 2012; Friguet 2002; Squier 2001). A este respecto, cabe mencionar que la edad está directamente asociada con los niveles circulantes de cLDLox (Paik et al. 2013). En este aspecto, se observa cómo a partir de la mediana edad se producen mayores niveles circulantes de cLDLox (O. Y. Kim et al. 2013; Paik et al. 2013; Donato et al. 2008). Los mecanismos implicados en esta asociación son una menor defensa antioxidante del organismo, acompañada de un incremento de los niveles de EO a nivel sistémico y local (Höhn et al. 2017; Fabian et al. 2012).

En este sentido, conforme incrementa la edad se observa una asociación inversa entre los niveles circulantes de cLDLox y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fabian et al. 2012). Esta enzima es la principal encargada de degradar el O_2^- . Un RL con importantes acciones fisiopatológicas sobre el sistema CV, entre las que se encuentra la inactivación del NO. Dicho evento trae como consecuencia un incremento en la formación de las cLDLox. A tenor de esto, la actividad de la SOD puede ser un modulador de los niveles de cLDLox dependiente de la edad (Dedoussis et al. 2008).

A lo que hay que añadir que los niveles de cLDLox en estos sujetos contribuyen a aumentar la formación del O_2^- en el endotelio vascular, debido a una mayor actividad de la NADPH oxidasa y a mayores niveles de ADMA (Fabian et al. 2012). Además, ADMA es un posible responsable de la regulación positiva del receptor LOX-1 celular (Smirnova et al. 2004), con las consecuencias que esto conlleva.

Respecto al **hábito tabáquico** es de sobra conocido su efecto inductor de EO (Kamceva et al. 2016; Ellegaard & Poulsen 2016; Metta et al. 2015; Frost-Pineda et al. 2011; Warner et al. 2010; Church & Pryor 1985; Lykkesfeldt et al. 1997; Munro et al. 1997). Esto es debido, principalmente, a que el humo del tabaco posee multitud de xenobióticos. Entre los cuales se encuentra una amplia gama de RL que pueden aumentar la presencia de daños oxidativos, como la peroxidación lipídica (Church & Pryor 1985). En este sentido, es importante señalar que el humo del tabaco promueve la oxidación de las cLDL (Ogawa et al. 2015; Kassi et al. 2009; Bloomer 2007; Ambrose & Barua 2004; Heitzer et al. 1996). Observándose en los fumadores (Ogawa et al. 2015; Kassi et al. 2009; Bloomer 2007) y ex fumadores mayores niveles de cLDLox en comparación con los sujetos que nunca han fumado (Ogawa et al. 2015). Asimismo, el efecto nocivo del tabaco sobre los niveles de cLDLox se ve incrementado cuando los sujetos fumadores presentan además, otros FRCV como la obesidad (Kassi et al. 2009) y/o dislipemias (Kassi et al. 2009; Heitzer et al. 1996).

Por otra parte, el fuerte vínculo mantenido entre la **DE** y los niveles cLDLox se debe, en gran medida, a que las cLDLox promueven el daño endotelial por múltiples y variados mecanismos (Trpkovic et al. 2015; Gradinaru et al. 2015; Zhai et al. 2015; Cao et al. 2013; Plant et al. 2008; Li & Mehta 2003; Penn & Chisolm 1994; Pirillo et al. 2013). Esto provoca efectos deletéreos, entre los que destaca la pérdida de la autorregulación del tono vasomotor del endotelio (Pirillo et al. 2013). A este respecto, se ha observado cómo los niveles circulantes de cLDLox tienen capacidad para determinan la respuesta micro y macrovasomotora, de forma independiente a los FRCV tradicionales (Matsumoto et al. 2004).

1.6. PREVENCIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS

Como se ha podido observar en apartados anteriores, la Aterosclerosis es la principal causa de morbimortalidad CV y de mortalidad global a nivel mundial. Este hecho convierte a la enfermedad aterosclerótica en un grave problema de salud pública internacional. Por esta razón, la Aterosclerosis debe prevenirse o revertirse en la medida de lo posible, actuando sobre los diversos FRCV ateroscleróticos que la promueven. En este sentido, según la OMS son especialmente eficientes para reducir la mortalidad CV los esfuerzos invertidos en la prevención primaria, especialmente enfocados a llevar a cabo estilos de vida saludables (hábitos dietéticos saludables, actividad física moderada de forma regular, no fumar, no tener un consumo de alcohol nocivo, etc.) (WHO 2014; WHO 2011b).

1.6.1. DIETA Y PREVENCIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS

La dieta es una de las piedras angulares en la prevención y el tratamiento de la Aterosclerosis y de sus diversos FRCV ateroscleróticos tradicionales (ESC/EAS 2016; WHO 2016a; WHO 2016c; WHO 2016b; Huang et al. 2016; WHO 2015c; Jhamnani et al. 2015; WHO 2013; WHO 2011b; Smith et al. 2011; FESNAD-SEEDO 2011; Kotseva et al. 2010; WHO 2009; I Graham et al. 2007; SEEDO 2007; WHO/FAO 2003; Lin et al. 2003; Lin et al. 2002; NCEP/ATP III 2002; NCEP/ATP III 2001). Además, en los últimos años, la dieta ha demostrado tener un papel esencial en la prevención y el tratamiento de FRCV emergentes, como la DE (Christoph et al. 2015; Ashor et al. 2015; Schwingshackl & Hoffmann 2014; Ashor et al. 2014; Storniolo et al. 2014; Medina-Remón et al. 2014; Li et al. 2013; Beavers et al. 2012; Mulvihill & Huff 2010; Chong et al. 2010; McCall et al. 2009; Tiano et al. 2007; Vita 2005; Watts et al. 2002) y los niveles circulantes elevados de cLDLox (Mateos et al. 2016; Verhoeven et al. 2015; Vilahur et al. 2015; Shanmuganayagam et al. 2012; EFSA 2011; Mulvihill & Huff 2010; Raederstorff 2009; Kamiyama et al. 2009; Dohadwala & Vita 2009; Covas et al. 2006; Pitsavos et al. 2005; Aviram et al. 2004; Marrugat et al. 2004; Aviram et al. 2002).

Entre las medidas dietéticas claves para reducir el RCV de la Aterosclerosis, la OMS recomienda reducir el consumo elevado que existe en la actualidad a nivel global de AGS (<10% del aporte calórico diario), de grasas trans (<1% del aporte calórico diario), de colesterol (<300 miligramos/día/persona) y de sal (<5 gramos/día/persona); así como incrementar el bajo consumo de frutas y verduras (≥ 400 gramos/día/persona) y de pescado [1-2 raciones/semana, donde cada ración proporcione un equivalente a 200-500 mg de ácido eicosapentaenoico (EPA, *siglas en inglés*) y docosahexaenoico (DHA, *siglas en inglés*)] (WHO 2011b; WHO/FAO 2003; WHO 2003).

En este sentido, es bien conocido cómo la cantidad de sal consumida a través de la dieta, es un factor que influye significativamente sobre los niveles de presión arterial que presenta un sujeto y por lo tanto, en su RCV (WHO 2011b; WHO/FSA 2010; Strazzullo et al. 2009; WHO 2003). A tenor de esto, la OMS recomienda una ingesta de sal menor a 5 gramos por persona y día para ayudar a prevenir las ECV (WHO 2011b; WHO/FSA 2010; WHO 2003). Sin embargo, la mayoría de los países consumen cantidades considerablemente superiores a las recomendadas (WHO 2011b; Strazzullo et al. 2009), estimándose una media global de 9-12 gramos por persona al día (WHO 2011b). Si dichos niveles se redujeran a los recomendados (<5 gramos/día/persona), disminuiría de manera importante el riesgo de

HTA y ECV (WHO/FSA 2010; Brown et al. 2009; He & MacGregor 2009). En este sentido, una modesta reducción de la ingesta de sal tiene un efecto significativo sobre la presión arterial, tanto en sujetos con presión arterial normal como elevada (He & MacGregor 2009). Existiendo una correlación directa entre la magnitud en la que se reduce la ingesta de sal y la magnitud en la que desciende la presión arterial (en un intervalo de ingesta diaria de 3 a 12 gramos por persona y día) (WHO 2011b; Brown et al. 2009; He & MacGregor 2009). Para ayudar a solucionar el problema, la OMS recomienda reducir el contenido de sal en los alimentos procesados, contribuyendo así a prevenir millones de muertes al año (WHO 2011b).

Por otra parte, el consumo frecuente de alimentos con alto aporte energético ricos en grasas y azúcares simples, como son los alimentos procesados, promueve el desarrollo de diversos trastornos, entre los que se encuentran el sobrepeso y obesidad (WHO/ISH 2007) y las ECV (WHO 2011b; WHO 2003). En este sentido, hay que destacar que las grasas dietéticas influyen sobremanera en el RCV, tanto en la cardiopatía coronaria como en el accidente cerebrovascular, debido a sus efectos sobre diversos mecanismos claves en el proceso aterosclerótico (WHO 2003). No obstante, este riesgo se puede modificar, en gran medida, alterando la composición cualitativa de las grasas ingeridas a través de la dieta. En este aspecto, se debe evitar el consumo elevado de AGS y de grasas trans, ya que se encuentran íntimamente relacionados con el desarrollo de las ECV (WHO 2011b; WHO 2003).

Las grasas trans, isómeros geométricos de los ácidos grasos insaturados cis, adoptan una configuración análoga a la de los AGS. La hidrogenación parcial, proceso utilizado para prolongar el tiempo de conservación de los AGP por el cual se elimina sus dobles enlaces, da lugar a los ácidos grasos trans. Diversos estudios han demostrado cómo los ácidos grasos trans provocan que la composición lipídica plasmática sea aún más aterogénica que la producida por los AGS (Katan 2000). En este sentido, es bien conocido desde hace años que la ingesta de ácidos grasos trans aumenta el riesgo de cardiopatía coronaria (WHO 2011b; WHO 2003; Oomen et al. 2001; Willett et al. 1993).

Las principales fuentes dietéticas de grasas trans son los aceites hidrogenados mediante procesos industriales, las comidas rápidas fritas y los alimentos horneados. Estas dos últimas suponen para la sociedad una fuente dietética de grasas trans cada vez mayor (WHO 2003; Katan 2000). Las medidas dietéticas para promover la salud CV deben tener en cuenta que la dieta aporte cantidades muy reducidas de ácidos grasos trans (aceites y

grasas hidrogenados), lo cual supone en la práctica una ingesta inferior al 1% del aporte calórico diario (WHO 2003). Este objetivo se vería favorecido mediante medidas como la eliminación o sustitución de las grasas trans de los productos alimentarios por AGP, que contribuyen a reducir el RCV (WHO 2003; Oomen et al. 2001; Willett et al. 1993) y a prevenir millones de muertes al año (WHO 2011b).

Por otra parte, el consumo elevado de AGS también se encuentra directamente relacionado con el incremento del RCV, especialmente en lo que se refiere a los ácidos grasos mirístico y palmítico (WHO 2003). A pesar de ser conocido este riesgo, la media global de ingesta de AGS se estima que está en un tercio o más del total de la grasas consumidas (WHO 2011b). Este consumo debería ser inferior al 10% del aporte calórico diario, y hasta menos del 7% en los grupos de alto riesgo (WHO 2003). En este aspecto, medidas como la sustitución de gran parte de los AGS consumidos por AGP procedentes de aceites vegetales, especialmente por el ácido linoleico, son importantes para reducir el RCV (WHO 2011b; WHO 2003).

También hay que tener en cuenta que las dietas deben proporcionar una cantidad adecuada de AGP (6-10% del aporte calórico diario), teniendo que mantener un equilibrio óptimo entre la ingesta de AGP ω -6 y ω -3 (5-8% y 1-2% del aporte calórico diario, respectivamente) (WHO 2003).

Asimismo, el consumo de ácido oleico, un AGM, debería completar la ingesta energética diaria de grasas hasta totalizar una ingesta equivalente al 15-30% del aporte calórico diario. Es importante señalar que estas recomendaciones sobre la ingesta total de grasas, deben basarse en los niveles de consumo observados en ese momento en la población de las distintas regiones y modificarse en función de la edad, la actividad física y el peso corporal ideal (WHO 2003).

La OMS recomienda el consumo regular de pescado (1-2 raciones/semana) al presentar efectos protectores frente a la morbilidad CV (WHO 2011b; WHO 2003). Estos efectos son debidos fundamentalmente a su alto contenido en ω -3 de cadena larga, entre los que se encuentra los ácidos grasos EPA y DHA. Por este motivo, la OMS recomienda que cada ración de pescado que se consuma proporcione un equivalente a 200-500 mg de EPA y DHA. A las personas vegetarianas se les recomienda llevar a cabo una ingesta adecuada de ácido α -linolénico (ALA, *siglas en inglés*) a través de fuentes vegetales.

La OMS estima, a través de lo observado en múltiples estudios en poblaciones de alto riesgo, que el consumo óptimo de 40-60 gramos al día de pescado conduce a una reducción, de aproximadamente el 50%, en la mortalidad causada por enfermedad coronaria (WHO 2003). En esta línea, también se ha observado una reducción significativa del riesgo de mortalidad CV en sujetos sin ECV, que tienen un consumo dietético adecuado de ω -3 de cadena larga (Sala-Vila et al. 2016; Hisamatsu et al. 2014).

Referente al consumo de frutas y verduras, la OMS calcula que aproximadamente 16 millones (1,0%) de DALYS (porcentaje de años de vida ajustado por incapacidad) y 1,7 millones (2,8%) de muertes a nivel mundial, son debidas a un bajo consumo de frutas y verduras (WHO 2009). Más específicamente, se calcula que la ingesta insuficiente de frutas y verduras causa alrededor del 14% de las muertes producidas por cáncer gastrointestinal, el 11% de las muertes por cardiopatía isquémica y el 9% de las muertes por accidente cerebrovascular en todo el mundo (WHO 2009). Este hecho remarca la importancia de tener un adecuado consumo de frutas y verduras, al contribuir de manera significativa a reducir el RCV (Wang et al. 2014; WHO 2011b; Kotseva et al. 2010; WHO 2009; Bazzano et al. 2003), entre otras patologías (WHO 2009).

En este aspecto, la evidencia disponible indica que los sujetos que consumen regularmente más frutas y verduras tienen una menor prevalencia de ECV y de FRCV (Li et al. 2013; Mulvihill & Huff 2010; Bazzano et al. 2003). Asimismo, diversos estudios han observado que existe una relación inversa entre la ingesta de frutas y verduras y la morbilidad CV (Wang et al. 2014; Zhang et al. 2011; Joshipura et al. 2001; Liu et al. 2000; Joshipura et al. 1999). Sin embargo, los mecanismos biológicos por los cuales las frutas y verduras ejercen sus efectos cardioprotectores no están del todo claros. Esto es debido a que las frutas y las verduras, además de contener diversos nutrientes beneficiosos para la salud CV como la fibra, vitaminas, minerales y oligoelementos (Alissa & Ferns 2017; Threapleton et al. 2013; Bazzano et al. 2003), poseen multitud de compuestos minoritarios bioactivos que podrían reducir el RCV (Alissa & Ferns 2017; Roberts & Moreau 2016; Del Bo' et al. 2015; Li et al. 2015; Li et al. 2013; de Figueiredo et al. 2013; Chong et al. 2010; Mulvihill & Huff 2010; Dohadwala & Vita 2009; Basu & Penugonda 2009; Vita 2005; Kris-Etherton et al. 2002; Aviram et al. 2002).

1.6.1.1. POLIFENOLES Y ATEROSCLEROSIS

Los compuestos minoritarios bioactivos son sustancias químicas fisiológicamente activas que se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas y en ciertos alimentos (frutas, verduras, frutos secos, especias, etc.), y cuyo consumo puede proporcionar efectos beneficiosos para la salud. Estos compuestos tienen papeles específicos en el crecimiento y supervivencia de las plantas, además de proporcionarlas características sensoriales y organolépticas (color, olor, textura, sabor, aroma, etc.).

Dentro de estos compuestos existe una gran diversidad, ya que varían ampliamente en su estructura química y función. Los principales compuestos minoritarios bioactivos se pueden clasificar en tres grandes grupos: compuestos fenólicos, terpenoides y compuestos azufrados. En este sentido, destacan los polifenoles, principales representantes de los compuestos fenólicos, por encontrarse ampliamente distribuidos en casi todos los alimentos de origen vegetal.

Los polifenoles son sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios, por lo que, desde un punto de vista bioquímico, se les conoce como metabolitos secundarios vegetales, aunque también se les llama sustancias fitoquímicas o fitonutrientes. Por lo general, las plantas los sintetizan como mecanismo de defensa frente a diversos factores ambientales adversos. Los polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos en la dieta, encontrándose principalmente en frutas, verduras, semillas, especias, aceites, y en bebidas como el vino y el té (Del Rio et al. 2013).

Los polifenoles tienen una amplia gama de acciones que promueven la salud, incluyendo efectos beneficiosos sobre la salud CV (Goszcz et al. 2017; Tresserra-Rimbau et al. 2014; Del Rio et al. 2013). A este respecto, numerosos estudios han observado cómo poblaciones cuya dieta es rica en polifenoles tienen un menor riesgo de morbilidad CV (Goszcz et al. 2017; Tresserra-Rimbau et al. 2014; Del Rio et al. 2013; Vita 2005). En este sentido, se ha establecido una asociación inversa entre el consumo de polifenoles y el RCV (Tresserra-Rimbau et al. 2014). Esta relación se muestra en diversos estudios entre los que se encuentra el estudio PREDIMED, donde el consumo más elevado de polifenoles comparado con el más bajo produjo una reducción del 46% del riesgo de sufrir eventos CV (Tresserra-Rimbau et al. 2014).

Algunos de los efectos cardioprotectores y antiateroscleróticos producidos por los polifenoles son: la mejora de la función endotelial (Li et al. 2013; Moreno-Luna et al. 2012; Valls et al. 2015; de Nigris et al. 2007; de Nigris et al. 2005; Vita 2005), la mejora de la presión arterial (Lockyer et al. 2016; Medina-Remón et al. 2014; Aviram et al. 2004; Shao et al. 2016; Tsang et al. 2012; Medina-Remón et al. 2011) y la disminución de la oxidación de las cLDL (Mateos et al. 2016; Moreno-Luna et al. 2012; Raederstorff 2009; Covas et al. 2006; Aviram et al. 2004). También pueden presentar un efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria anormal (Ostertag et al. 2010; Vita 2005), un efecto antiinflamatorio (Tangney & Rasmussen 2013; Khan et al. 2014), y un efecto regulador del metabolismo lipídico y glucémico (Guo et al. 2016), etc.

Estos efectos cardioprotectores y antiateroscleróticos pueden producirse a través de múltiples mecanismos, entre los que sobresale la gran capacidad antioxidante de diversos polifenoles. Esta capacidad se debe a que algunos polifenoles poseen una potente acción captadora o de barrido de RL, consiguiendo así reducir o neutralizar los daños oxidativos producidos sobre diversas biomoléculas (Goszcz et al. 2017; Del Rio et al. 2013).

Dentro de los polifenoles destacan por su gran poder antioxidante el hidroxitirosol (HT) y la punicalagina (PC). Entre los alimentos ricos en PC se encuentran las granadas, mientras que el HT está presente en las aceitunas y en los aceites de oliva virgen. Estos alimentos han sido ampliamente estudiados desde hace décadas por sus múltiples efectos beneficiosos sobre la salud. Estos efectos son mediados por acciones antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, hipoglucemiantes, hipolipemiantes, hipotensivas, antimutagénicas, antígenotóxicas, etc. (Sahebkar et al. 2017; Shahbaz et al. 2016; Santangelo et al. 2016; Hosseini et al. 2016; Carnevale et al. 2016; Elwej et al. 2016; Hernaez et al. 2015; Rosenblat et al. 2015; Sohrab et al. 2015; Tsang et al. 2012; Moreno-Luna et al. 2012; Kelishadi et al. 2011; Camargo et al. 2010; Konstantinidou et al. 2010; Basu & Penugonda 2009; Razquin et al. 2009; Aviram et al. 2008; Rock et al. 2008; de Nigris et al. 2006; Covas et al. 2006; Fuhrman et al. 2005; Owen et al. 2000; Aviram et al. 2000). Siendo algunas de dichas acciones las que les confieren un importante papel como cardioprotectores.

En los últimos años, se ha señalado al HT y a la PC como los principales responsables de los efectos beneficiosos CV de dichos alimentos. En este sentido, diversos estudios, principalmente *in vitro* y en animales de experimentación, atribuyen a estos compuestos bioactivos importantes propiedades cardioprotectoras y antiateroscleróticas (Lockyer et

al. 2016; Lockyer et al. 2015; Vilahur et al. 2015; Achmon & Fishman 2015; De Bock, Derraik, et al. 2013; Bulotta et al. 2014; Zrelli et al. 2013; EFSA 2011; Zrelli, Matsuoka, Kitazaki, Araki, et al. 2011; Zrelli, Matsuoka, Kitazaki, Zarrouk, et al. 2011; De Nigris et al. 2007; Raederstorff 2009; Hu et al. 2014; Visioli et al. 2000). Por esta razón, la ingesta de cantidades adecuadas de estos compuestos bioactivos podría ayudar a reducir la morbimortalidad CV.

El HT es un polifenol perteneciente a la familia de los alcoholes fenólicos que se encuentra, como se ha mencionado anteriormente, en alimentos como las aceitunas y los aceites de oliva virgen y extra-virgen, tanto en su forma libre como en forma de oleuropeína. La oleuropeína es un glucósido que proporciona sabor amargo y puede llegar a constituir hasta un 14% del peso en seco del fruto del olivo (Hu et al. 2014). La oleuropeína se hidroliza durante el proceso de maduración de la oliva, dando lugar a metabolitos entre los que se encuentra el HT. Es importante señalar que el HT no se encuentra presente en los aceites refinados, ya que este compuesto se elimina mediante dicho proceso.

El HT es un compuesto con gran capacidad antioxidante. De hecho, es considerado como uno de los antioxidantes naturales más potentes. Esta capacidad se puede atribuir especialmente a la posición de sus grupos hidroxilos (Hu et al. 2014).

El HT posee características antioxidantes mucho más eficaces que otros compuestos fenólicos presentes en la oliva y/o productos derivados (Raederstorff 2009). Esto se debe a que lleva a cabo una potente acción captadora de RL, contribuye a la ruptura de la cadena de reacciones peroxidativas y por ende, coadyuva en la prevención de la peroxidación lipídica, etc. (Hu et al. 2014). En este sentido, el HT muestra importantes acciones antiateroscleróticas como proteger contra la oxidación de las cLDL y contra el daño endotelial, mejorar el perfil lipídico y glucémico, actuar como hipotensivo y antiagregante, entre otras (Lockyer et al. 2016; Lockyer et al. 2015; Hu et al. 2014; Giordano et al. 2014; De Bock, Derraik, et al. 2013; Bulotta et al. 2014; Zrelli et al. 2013; EFSA 2011; Zrelli, Matsuoka, Kitazaki, Araki, et al. 2011; Zrelli, Matsuoka, Kitazaki, Zarrouk, et al. 2011; Raederstorff 2009). Cabe mencionar que dichos efectos se han observado principalmente en estudios *in vitro* y en animales de experimentación, siendo en la actualidad escasos los ensayos clínicos donde se hayan evaluado sus efectos cardioprotectores (Lockyer et al. 2016; Lockyer et al. 2015; De Bock, Derraik, et al. 2013).

La PC es un tanino hidrolizable que pertenece a la subclase de elagitaninos. La PC es el principal elagitanino de la granada y puede hidrolizarse a ácido elágico (EA, *siglas en inglés*), otro polifenol con importante acción antioxidante. La PC se encuentra en diversas partes de la granada (pulpa, semilla, cascara, etc.) y es el principal responsable de la actividad antioxidante de esta fruta. Esto se debe a que presenta la mayor capacidad captadora de RL de los compuestos de la granada (Kulkarni et al. 2007).

La PC ha demostrado poseer, en múltiples estudios *in vitro* y en animales de experimentación, efectos antiateroscleróticos a través de acciones antioxidantes, antiinflamatorias, de mejora de la función endotelial, hipotensivas, reguladoras del perfil lipídico y glucémico, entre otras (Shao et al. 2016; Cao et al. 2015; Vilahur et al. 2015; Kumagai et al. 2015; X. Xu et al. 2014; Hamoud et al. 2014; Kawakami et al. 2014; Banihani et al. 2013; Rosenblat et al. 2013; Fuhrman et al. 2010; Chen et al. 2008; De Nigris et al. 2007). A este respecto, cabe destacar que en la actualidad no hemos encontrado ningún ensayo clínico que haya evaluado los efectos cardioprotectores de esta molécula bioactiva de forma específica.

Por otra parte, tanto el HT como la PC han demostrado tener una óptima biodisponibilidad y seguridad en humanos, tanto al ser administrados dentro de matrices alimentarias como de forma independiente (FDA 2016; Lebrero et al. 2015; Kirkland et al. 2015; Auñón-Calles et al. 2013; EFSA 2011; EMA 2011; Heber et al. 2007; Soni et al. 2006; Cerdá et al. 2003; D'Angelo et al. 2001).

Las propiedades antiateroscleróticas del HT y la PC han cobrado especial interés en los últimos años, debido al desarrollo de nuevas direcciones en la investigación biomédica sobre la prevención primaria de la Aterosclerosis. Éstas incluyen la utilización de compuestos bioactivos con propiedades antiateroscleróticas como terapia o coadyuvante de las terapias establecidas. En este sentido, la ingesta de estos compuestos bioactivos, en cantidades adecuadas, podría contribuir a evitar o revertir el proceso aterosclerótico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

En el presente estudio se plantea la hipótesis de que la suplementación oral con hidroxitirosol (HT) y punicalagina (PC) mejore marcadores tempranos de la Aterosclerosis en sujetos de mediana edad, aparentemente sanos sin Enfermedad Cardiovascular (ECV) establecida.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio está dirigido a evaluar el efecto de la suplementación oral con HT y PC, sobre marcadores tempranos del proceso aterogénico relacionados con la fase asintomática de la Aterosclerosis, en población adulta de mediana edad, aparentemente sana sin ECV establecida. En concreto, sobre factores de riesgo cardiovascular (FRCV) emergentes como la disfunción endotelial (DE) y los niveles circulantes elevados de cLDLox:

- Parámetro indicador de la función endotelial vascular:
 - Dilatación mediada por flujo (DMF) de la arteria braquial
- Parámetro indicador de los niveles circulantes de cLDLox:
 - Niveles séricos de cLDL oxidada (cLDLox)

Como parte de los objetivos secundarios se evaluaron otras variables relacionadas con la Aterosclerosis:

- Parámetros indicadores de la función vascular:
 - Presión arterial: Presión arterial sistólica (PAS) y Presión arterial diastólica (PAD)
 - Frecuencia cardíaca (FC)
 - Dilatación mediada por flujo (DMF) de la arteria braquial
- Parámetros séricos indicadores del estado oxidativo:
 - cLDL oxidada (cLDLox)
 - 8-isoprostanos (8-iso-PGF_{2α})

- Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, *siglas en inglés*)
- Capacidad de la reducción férrica del plasma (FRAP, *siglas en inglés*)
- Paraoxonasa 1 (PON-1)
- Nitratos y Nitritos [NO(x)]

- Parámetros séricos indicadores del estado inflamatorio:
 - Proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us)
 - Fibrinógeno
 - Interleucina 6 (IL-6)
 - Molécula de adhesión celular vascular 1 soluble (sVCAM-1, *siglas en inglés*)

- Parámetros séricos relacionados con el perfil glucémico y lipídico:
 - Glucosa basal
 - Colesterol Total
 - Lipoproteína de baja densidad (cLDL)
 - Lipoproteína de alta densidad (cHDL)
 - Triglicéridos

- Parámetros antropométricos y de composición corporal:
 - Peso
 - Índice de masa corporal (IMC)
 - Circunferencia de cintura (CCi)
 - Masa grasa (MG)
 - Masa libre de grasa (MLG)
 - Masa muscular (MM)

- Y parámetros séricos evaluadores de efectos adversos:
 - Transaminasas: Alanina aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST)
 - Fosfatasa Alcalina (FA)
 - Creatinina
 - Urato

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo de investigación del presente estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz (HULP) y registrado con el Código HULP 4092 para su consulta.

El presente estudio fue inscrito en la base de datos mundial de registros y resultados de Ensayos Clínicos con el número NCT02042742 (<http://clinicaltrials.gov>).

3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ESTUDIO

El presente estudio es un ensayo clínico cruzado, controlado, aleatorizado y doble ciego, con un periodo de duración de 20 semanas y un tamaño muestral de 67 sujetos.

El objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto del consumo regular de un suplemento antioxidante (SAX) rico en Hidroxitirosol (HT) y Punicalagina (PC), sobre diversos biomarcadores tempranos del proceso aterogénico en sujetos de mediana edad sin ECV establecida.

El estudio estuvo constituido por dos secuencias de tratamiento (Placebo/SAX y SAX/Placebo), cuyos periodos de intervención (Placebo y SAX) tuvieron una duración de 8 semanas cada uno de ellos. Entre ambos hubo un periodo de lavado de 4 semanas. Durante estos periodos de intervención los sujetos consumieron 3 cápsulas/día (con las principales comidas) del suplemento o del placebo, dependiendo del periodo de intervención en el que se encontraran en cada momento.

El suplemento estuvo compuesto por 9,9 mg de HT y 195 mg de PC, y el placebo solo por maltrodextrina. Los participantes del estudio fueron distribuidos a las diferentes secuencias de forma aleatoria, de modo que ni los investigadores ni los participantes sabían a que secuencia de intervención eran asignados. Por lo tanto, desconocían que tratamiento se consumía en cada periodo. Los investigadores permanecieron cegados hasta el final del estudio, produciéndose el desenmascaramiento al finalizar el análisis estadístico de los datos recogidos durante el mismo.

El estudio se realizó según la normativa descrita en la Declaración de Helsinki y las enmiendas relativas a la investigación biomédica en humanos (Puri et al. 2009). Además de seguir los protocolos y principios de Buenas Prácticas Clínicas (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1996), y los reglamentos establecidos por la Comisión Europea (CEC 2014; CEC 1991; CEC 2005; CEC 2003; CEC 2001).

3.2. MÉTODO DE ALEATORIZACIÓN

El procedimiento de aleatorización de los participantes a las diferentes secuencias de intervención fue proporcionado por la Unidad de Bioestadística del HULP. Para realizar la distribución aleatoria de forma homogénea, se tuvo en cuenta tanto el género del sujeto como el tamaño muestral calculado para cada uno de los grupos. En la aleatorización se asignó un número al azar a cada uno de los sujetos seleccionados para participar en el estudio, que le hizo pertenecer a uno de los grupos del mismo.

Los datos de aleatorización fueron estrictamente confidenciales, sólo tuvieron acceso a ellos el personal autorizado hasta el momento del desenmascaramiento.

El desenmascaramiento se llevó a cabo una vez finalizado el estudio, verificada la ausencia de incumplimiento del protocolo, y revisados y analizados los datos. En este momento se procedió a abrir los códigos que habían sido facilitados por la empresa suministradora de los tratamientos (PROBELTE PHARMA S.A.).

3.3. TÉCNICAS DE ENMASCARAMIENTO Y CIEGO

El enmascaramiento del estudio se consiguió mediante el uso de cápsulas y envases de los diversos tratamientos (SAX y Placebo) con idéntica apariencia externa. La empresa PROBELTE PHARMA S.A. (Murcia, España) fue la encargada de elaborar, empaquetar, etiquetar y suministrar a los investigadores los diversos productos. Los envases fueron etiquetados con los códigos de lote L1 y L2, de los cuales se desconocía a que tratamiento correspondían. La asignación de los códigos de los productos solo se conoció en el momento de la apertura del ciego.

3.4. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

El reclutamiento de los sujetos fue realizado por el personal investigador de la Unidad de Nutrición del HULP a través de volantes informativos, correos electrónicos, sesiones informativas, etc.

Los criterios de exclusión e inclusión del presente estudio fueron los siguientes:

➤ Criterios de inclusión:

Para poder ser incluidos en el estudio, los sujetos debían cumplir todos y cada uno de los siguientes criterios:

- Hombres y mujeres con una edad comprendida entre 45 y 65 años.
- Adecuado nivel cultural y de comprensión del estudio.
- Estar de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio y en firmar el consentimiento informado del mismo (**Anexo 1**).

➤ Criterios de exclusión:

- Sujetos con factores de riesgo cardiovascular (FRCV) bajo tratamiento farmacológico (dislipemias, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus, etc.).
- Sujetos diagnosticados de síndrome metabólico.
- Sujetos con IMC ≥ 30 kg/m² (obesidad).
- Sujetos con diagnóstico de alguna enfermedad grave (hepática, renal, cáncer, etc.).
- Sujetos con antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular (CV) prematura.
- Sujetos con diagnóstico de enfermedad o trastorno mental o que presentaran baja capacidad cognitiva.
- Sujetos que consumieran alguno de los medicamentos o suplementos restringidos por el protocolo del estudio (estatinas, fibratos, diuréticos, corticoides, antidiabéticos orales, insulina, tratamiento hormonal sustitutivo, digoxina, acenocumarol, warfarina, suplementos antioxidantes, suplementos de omega 3, vitaminas, minerales, prebióticos, probióticos, etc.) por su posible interferencia en la respuesta del suplemento administrado en este estudio.

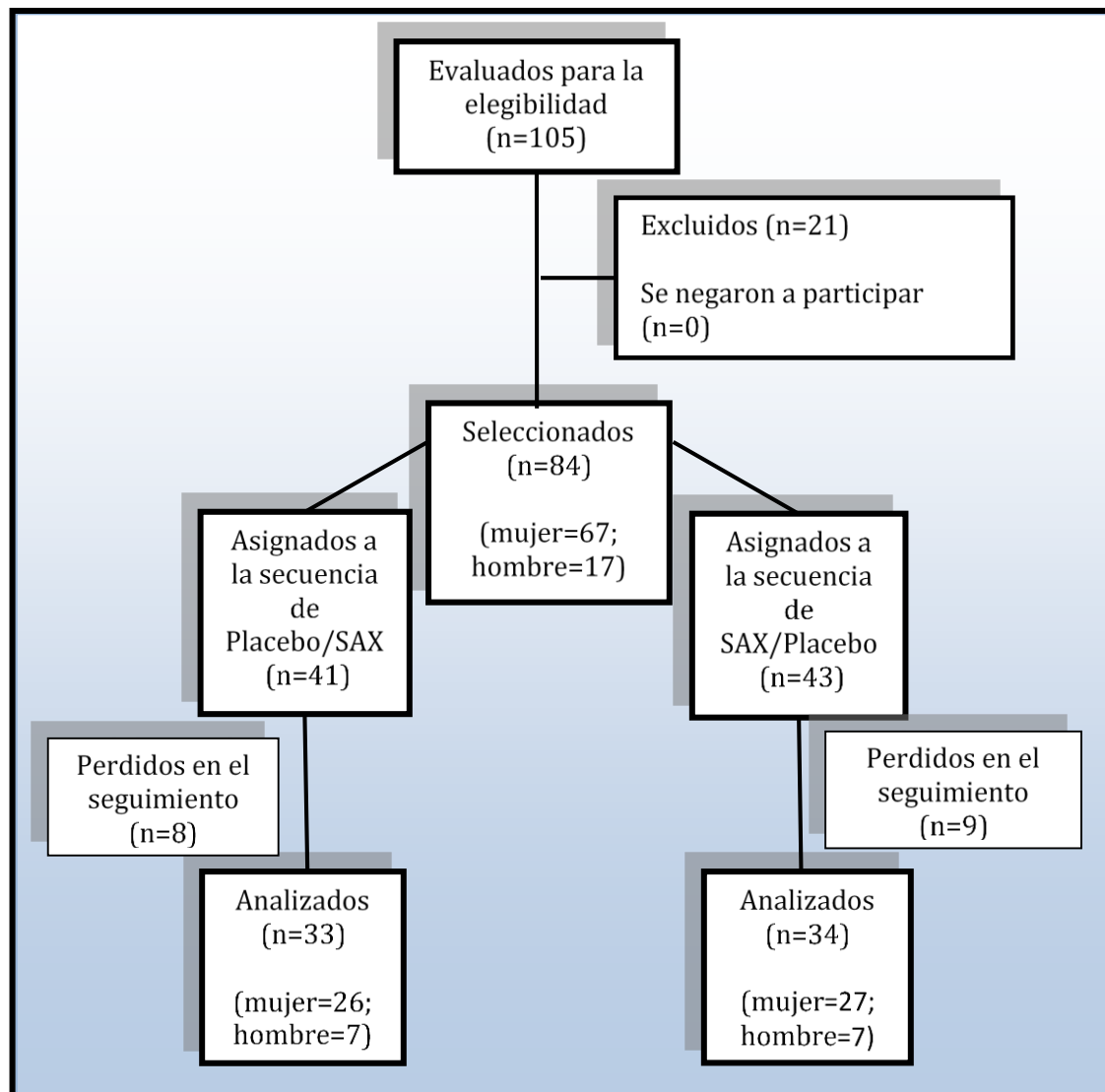
- Mujeres que aún mantuvieran sus ciclos menstruales y no se encontraran en postmenopausia.
- Sujetos con un consumo de alcohol >30 g/día (lo que equivale a 300 cc de vino con una graduación media de 12 grados, a 750 cc de cerveza con una graduación media de 5 grados o a 75 cc de whisky, coñac, anís, etc. con una graduación media de 40 grados).
- Sujetos que pretendían dejar de fumar, bajar de peso o cambiar de forma significativa sus hábitos dietéticos o de actividad física durante las 20 semanas de duración del estudio.
- Sujetos con alergias conocidas a la oliva o a la granada o a sus derivados.
- Sujetos que realizaran de manera habitual actividad física intensa.
- Cualquier otro criterio de exclusión que el investigador principal del estudio considerara relevante.

3.5. SUJETOS DEL ESTUDIO

En la fase previa al inicio del ensayo estuvieron interesados en participar 105 sujetos, de los cuales fueron excluidos 21 sujetos por no cumplir con los criterios de selección. Tras verificar los criterios de inclusión y exclusión fueron seleccionados 84 sujetos para participar en el estudio (**Figura 1**). Todos los sujetos seleccionados tuvieron que firmar el consentimiento informado (**Anexo 1**) de acuerdo con las normas éticas de la Declaración de Helsinki (Puri et al. 2009).

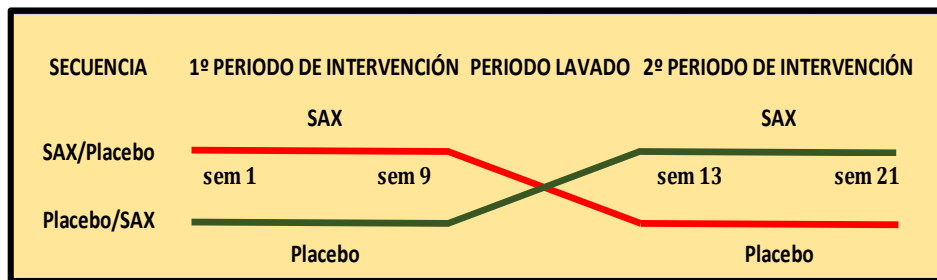
De los 84 sujetos (mujeres=67, hombres=17), 41 sujetos fueron asignados aleatoriamente a la secuencia Placebo/SAX y 43 sujetos a la secuencia SAX/Placebo. Durante el transcurso de la intervención, 17 sujetos (20,2%) abandonaron el estudio por razones personales (8 sujetos en la secuencia Placebo/SAX y 9 sujetos en la secuencia SAX/Placebo), no registrándose ningún efecto adverso durante el mismo. Al final del estudio quedaron 67 sujetos, de los cuales 33 sujetos (mujeres=26, hombres=7) seguían la secuencia Placebo/SAX y 34 sujetos (mujeres=27, hombres=7) la secuencia SAX/Placebo (**Figura 1**). Los 67 sujetos que finalizaron el estudio fueron los evaluados en el análisis estadístico al tratarse de un estudio de diseño cruzado.

Figura 1. Diagrama de flujo que describe el ensayo clínico.



3.6. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio es un ensayo clínico de diseño cruzado constituido por dos secuencias de intervención (Placebo/SAX y SAX/Placebo) y dos periodos de tratamiento (Placebo y SAX), entre los que se situó un periodo de lavado (**Figura 2**). Todos los participantes del estudio recibieron ambos tratamientos, aunque en periodos de intervención diferentes. Esto permitió que cada sujeto ejerciera de su propio control, evitando así la variabilidad interindividual (Senn 2003; Piantadosi 2005).

Figura 2. Resumen de distribución de los tratamientos según la secuencia asignada.

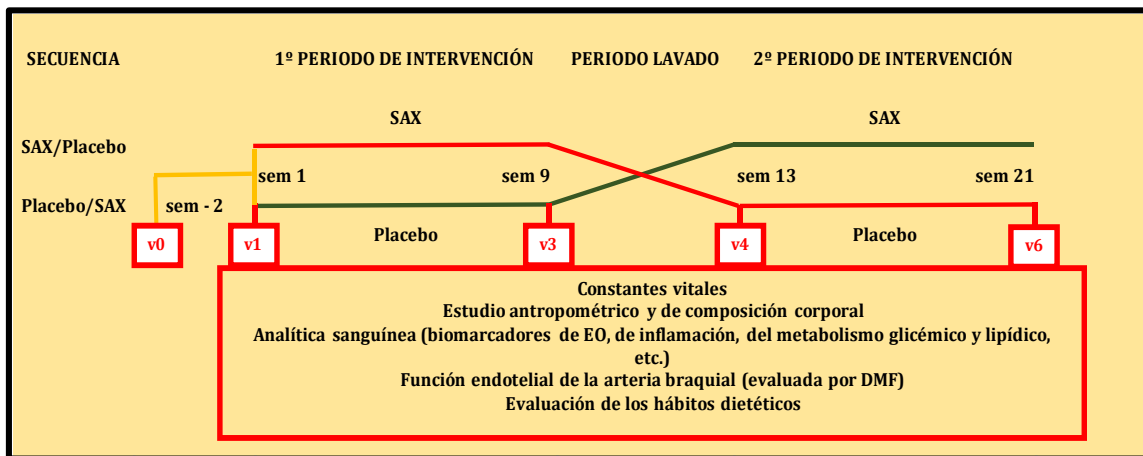
Como se ha mencionado anteriormente, la población del estudio fue distribuida de forma homogénea a las diversas secuencias, al tener en cuenta tanto el género del sujeto como el tamaño muestral calculado para cada grupo. Ambos grupos recibieron, aunque en periodos de intervención diferentes, los dos tratamientos (Placebo y SAX):

- El grupo que fue aleatoriamente asignado a la secuencia SAX/Placebo consumió durante el primer periodo de intervención 3 cápsulas/día del suplemento (SAX). Las cápsulas debían ser ingeridas junto con las principales comidas (desayuno, comida y cena). Una vez transcurridas las primeras 8 semanas del estudio (1º periodo de intervención), los participantes pasaron 4 semanas sin consumir ninguno de los tratamientos del estudio (periodo de lavado). Una vez finalizado el periodo de lavado los participantes tomaron, durante el segundo periodo de intervención, 3 cápsulas/día del tratamiento control (Placebo) junto con las principales comidas (desayuno, comida y cena) durante las últimas 8 semanas del estudio (2º periodo de intervención).
- El grupo que fue aleatoriamente asignado a la secuencia Placebo/SAX consumió, durante el primer periodo de intervención, 3 cápsulas/día del tratamiento control (Placebo). Las cápsulas debían ser consumidas junto con las principales comidas (desayuno, comida y cena). Una vez finalizadas las primeras 8 semanas del estudio (1º periodo de intervención), los participantes pasaron por un periodo de lavado de 4 semanas de duración, donde no tomaron ninguno de los tratamientos del ensayo. Tras el periodo de lavado, los participantes consumieron, durante el segundo periodo de intervención, 3 cápsulas/día del suplemento (SAX) junto con las principales comidas (desayuno, comida y cena) durante las últimas 8 semanas del estudio (2º periodo de intervención).

3.7. DISTRIBUCIÓN DE LAS VISITAS DEL ESTUDIO

La selección y el seguimiento de los participantes del estudio se llevó a cabo en la Unidad Clínica de Investigación y Ensayos Clínicos (UCICEC) del HULP, siguiendo el siguiente calendario de visitas (**Figura 3**):

Figura 3. Resumen de las principales visitas durante el estudio.



❖ Fase de Selección.

➤ Visita 0 (V0) (semana -2):

- ♦ Los participantes fueron seleccionados aplicando los criterios de inclusión/exclusión recogidos en el protocolo del ensayo. Se les facilitó la información del estudio de forma verbal y escrita, debiendo firmar el consentimiento informado tras haber recibido y comprendido la información mencionada (**Anexo 1**).
- ♦ Una vez se comprobó que cumplían con todos los criterios de inclusión y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión, y habían firmado el consentimiento informado, se les registró a cada uno de ellos en una hoja de seguimiento individual [Cuaderno de Recogida de Datos (CRD)], y se les hizo entrega de:

- Un registro de consumo de alimentos de 72 horas (3 días, uno de ellos festivo) (**Anexo 2**) y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (**Anexo 3**), que debían cumplimentar en los días previos al comienzo de la intervención.
 - Se les instruyó para que mantuviesen sus hábitos dietéticos y de estilo de vida en general, durante todo el estudio. Se les hizo especial hincapié en que no incrementaran el consumo de alimentos antioxidantes fuera de su consumo habitual (especialmente aquellos derivados de la granada o de la oliva), facilitándoles un listado de los mismos (**Anexo 4**).
 - Un hoja de registro para anotar los medicamentos o tratamientos concomitantes que tomaran durante el estudio (**Anexos 5 y 6**) y un cuestionario, en el caso de los fumadores, para registrar el número de cigarrillos consumidos durante el mismo (**Anexo 7**).
 - Un volante para la realización de los análisis sanguíneos.
- ◆ En esta visita, también se concertó la fecha y la hora para la siguiente visita programada en 15 días contando a partir de la misma.

❖ Periodo de intervención

Tras la selección, los participantes fueron asignados a 2 grupos de estudio. Cada grupo recibió los tratamientos (SAX y Placebo) en periodos experimentales diferentes en función de la secuencia asignada.

Cada sujeto realizó 6 visitas a la UCICEC del HULP, donde se llevó a cabo el seguimiento:

- Visita 1 (V1) y Visita 4 (V4) (semanas 1 y 13)
- ◆ Durante estas visitas se proporcionó a los participantes del estudio el número de cápsulas exactas que debían de consumir durante las siguientes 4 semanas, contando a partir de esa misma visita.
 - ◆ Además, durante cada una de estas visitas se completó su historia clínica y se tomaron las siguientes mediciones:
 - Constantes vitales: tensión arterial y frecuencia cardiaca.
 - Medida de la Dilatación Mediada por Flujo (DMF) de la arteria braquial.

- Antropometría completa: se recogieron datos del peso, la talla (a partir de los cuales se calculó el IMC) y la circunferencia de la cintura (CCi).
- Composición corporal: se midió mediante la técnica de impedancia bioeléctrica (BIA, *siglas en inglés*) y se obtuvo el porcentaje de Masa Libre de Grasa (MLG%), Masa Muscular (MM%) y Masa Grasa (MG%).
- Analítica completa: se recogieron muestras de sangre en ayunas para determinar los siguientes parámetros:
 - Parámetros del estado oxidativo: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (cLDLox), 8-isoprostanos (8-iso-PGF_{2α}), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP, *siglas en inglés*), paraoxonasa 1 (PON-1), y nitratos y nitritos [NO(x)].
 - Parámetros del estado inflamatorio: Proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us), fibrinógeno, interleucina 6 (IL-6) y molécula de adhesión celular vascular 1 soluble (sVCAM-1, *siglas en inglés*).
 - Parámetros del metabolismo glicémico y lipídico: Glucosa basal, colesterol total, lipoproteína de baja densidad (cLDL), lipoproteína de alta densidad (cHDL) y triglicéridos.
 - Marcadores de seguridad: Alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA), creatinina y urato.
- ♦ Se facilitó el material que debían cumplimentar y entregar en la siguiente visita:
 - o Un registro de consumo de alimentos de 72 horas (3 días, uno de ellos festivo) (**Anexo 2**) y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (**Anexo 3**), que debían cumplimentar durante las semanas previas a la siguiente visita.
 - o Una hoja de registro para anotar los medicamentos o tratamientos concomitantes que tomaran durante el estudio (**Anexos 5 y 6**) y un cuestionario, en el caso de los fumadores, para registrar el número de cigarrillos consumidos durante el mismo (**Anexo 7**).
 - o Un diario sobre el consumo del tratamiento asignado (**Anexos 5 y 8**) y unos cuestionarios sobre los efectos adversos y la tolerancia experimentada al consumo del mismo (**Anexos 5 y 9**).
- ♦ El investigador revisó la cumplimentación de las Encuestas Nutricionales entregadas en la visita anterior (Frecuencia de Consumo de Alimentos y Registro de consumo de

alimentos de 72 horas) y completó, junto con el participante, la información faltante. Los cuestionarios fueron entregados por los participantes revisados e íntegramente cumplimentados.

- ♦ Se volvió a indicar a los participantes que, durante el estudio, debían de mantener sus hábitos dietéticos y de estilo de vida habituales, así como conservar el consumo de alimentos antioxidantes dentro de lo usual (especialmente de la granada y de la oliva y de sus derivados) (**Anexo 4**).
 - ♦ Se anotó en el registro de distribución/devolución del producto en la V1 la cantidad de producto entregado, y en la V4 la cantidad de producto entregado y devuelto por cada uno de los participantes (**Anexo 10**).
 - ♦ En estas visitas se concertó la fecha y la hora de la siguiente visita del estudio.
- Visita 2 (V2) y Visita 5 (V5) (semanas 5 y 17)

En estas visitas se realizó:

- ♦ Control del peso corporal.
- ♦ Recogida del registro de consumo de alimentos de 72 horas (**Anexo 2**) y del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos de las semanas anteriores (**Anexo 3**).
- ♦ Recogida del diario sobre el consumo del tratamiento asignado (**Anexos 5 y 8**) y de los cuestionarios sobre los efectos adversos y la tolerancia experimentada al consumo del mismo (**Anexos 5 y 9**).
- ♦ Se volvió a indicar a cada participante que mantuviera sus hábitos dietéticos y de estilo de vida en general, durante todo el estudio.
- ♦ Se volvió a hacer hincapié en que no debían incrementar el consumo de alimentos antioxidantes fuera de su consumo habitual (especialmente de la granada y de la oliva y de los derivados de los mismos) (**Anexo 4**).

- ♦ Se anotó en el registro de distribución/devolución del producto la cantidad de producto entregado y la cantidad de producto devuelto por cada uno de los participantes (**Anexo 10**).
 - ♦ Se proporcionó a los participantes las cápsulas que debían tomar durante las siguientes 4 semanas, contando a partir de ese día.
 - ♦ Además, se facilitó el material que debían cumplimentar y entregar en la siguiente visita:
 - o Un diario donde debían registrar cada día el consumo del tratamiento (**Anexos 5 y 8**) y unas hojas de registro para anotar los acontecimientos adversos y la tolerancia que experimentasen al consumo del mismo (**Anexos 5 y 9**).
 - o Un registro de consumo de alimentos de 72 horas (3 días, uno de ellos festivo) (**Anexo 2**) y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos que debían cumplimentar en las semanas previas a la siguiente visita (**Anexo 3**).
 - o Un volante para la realización del análisis sanguíneo programado el día de la siguiente visita.
 - o Una hoja de registro para anotar los medicamentos o tratamientos concomitantes que tomaran (**Anexos 5 y 6**) y un cuestionario, en el caso de los fumadores, para registrar el número de cigarrillos consumidos durante los 10 días previos a la siguiente visita (**Anexo 7**).
 - ♦ Durante estas visitas se entregó a cada participante la citación para la siguiente visita.
- Visita 3 (V3) (semana 9)
- ♦ En esta visita se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en la Visita 1 (V1), a excepción de que los participantes debían dejar de tomar el tratamiento del estudio asignado hasta la siguiente visita (Periodo de lavado), en la cual se les asignaría un tratamiento diferente al consumido anteriormente.
 - ♦ En esta visita se facilitó el material que debían cumplimentar y entregar en la siguiente visita:

- o Un registro de consumo de alimentos de 72 horas (3 días, uno de ellos festivo) (**Anexo 2**) y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (**Anexo 3**) que debían de cumplimentar en los días previos al comienzo de la siguiente intervención.
 - o Un volante para la realización de análisis sanguíneo el día de la siguiente visita.
 - o Una hoja de registro para anotar los medicamentos o tratamientos concomitantes que tomaran durante el estudio (**Anexos 5 y 6**) y un cuestionario, en el caso de los fumadores, para registrar el número de cigarrillos consumidos durante el mismo (**Anexo 7**).
- Visita 6 (V6) (semana 21)
- ♦ Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en la Visita 1 (V1), excepto la entrega de cuestionarios o registros para cumplimentar y el suministro de productos a consumir. Además, se les entregó una guía con pautas para llevar a cabo una alimentación saludable.

3.8. CÁPSULAS DE LOS TRATAMIENTOS (SAX Y PLACEBO)

Las dosis administradas en el presente estudio están de acuerdo con las dosis reportadas en la literatura (De Bock, Thorstensen, et al. 2013; De Bock, Derraik, et al. 2013; Vilahur et al. 2015; De la Torre-Robles et al. 2014; Blekas et al. 2002; Brenes et al. 1999; Gil et al. 2000; EFSA 2011).

Cada cápsula del suplemento antioxidante (SAX) contenía 3,3 mg de HT, 65 mg de PC y 331,7 mg de maltrodextrina, mientras que las cápsulas de Placebo solo contenía maltrodextrina (400 mg) (**Cuadro 1**). La dosis diaria del suplemento aportó 9,9 mg de HT, 195 mg de PC y 995,1 mg de maltodextrina, al tener que ingerir los participantes 3 cápsulas/día. Las cápsulas de los tratamientos fueron elaboradas por la empresa PROBELTE PHARMA S.A.

Cuadro 1. Composición de las cápsulas (SAX y Placebo).

Tratamiento			SAX		Placebo	
Composición por cápsula	Punicalagina (PC) (mg)	65	Punicalagina (PC) (mg)		0	
	Hidroxitirosol (HT) (mg)	3,3	Hidroxitirosol (HT) (mg)		0	
	Maltrodextrina (mg)	331.7	Maltrodextrina (mg)		400	
	Cobertura de cápsula	gelatina	Cobertura de cápsula		gelatina	
Posología	3 cápsulas/día		3 cápsulas/día			
	Preferentemente con las comidas		Preferentemente con las comidas			
Vía de administración	Oral		Oral			
Laboratorio elaborador	PROBELTE PHARMA S.A.		PROBELTE PHARMA S.A.			

Los sujetos recibieron durante las visitas al UCICEC del HULP de manos de los investigadores, las cápsulas necesarias para completar las 8 semanas de duración que tenía cada uno de los periodos de intervención (SAX y Placebo).

3.9. EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO

Debido a que los diversos tratamientos del estudio (SAX y Placebo) fueron consumidos por los participantes en sus domicilios, el control del cumplimiento se realizó mediante la devolución de todos los envases llenos o vacíos al investigador principal al final de cada visita. El investigador fue el encargado de contabilizar y registrar cuántas cápsulas habían sido consumidas por cada uno de los participantes en el registro de distribución/devolución del producto (**Anexo 10**). Además, se suministró a todos los participantes unas Hojas-Diario que tuvieron que rellenar anotando todos los incumplimientos e infracciones de la toma del tratamiento (**Anexos 5 y 8**). Estas Hojas-Diario fueron entregadas al investigador principal en cada visita, quién valoró la adhesión al tratamiento asignado del participante.

3.10. TRATAMIENTOS CONCOMITANTES

No se permitió la toma de ningún medicamento a lo largo del estudio, salvo en casos excepcionales los cuales fueron evaluados y anotados por los investigadores en el CRD del participante. Dicha restricción fue especialmente fuerte en aquellos medicamentos que pudieran interferir con los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos evaluados en el estudio.

El investigador principal del ensayo, en el caso de que consumieran fármacos los participantes, debía juzgar la idoneidad de la continuidad en el estudio del participante.

3.11. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS Y DE LA TOLERANCIA A LOS TRATAMIENTOS DEL ESTUDIO

Para la recogida y notificación de los acontecimientos o efectos adversos que a continuación se describe, se siguieron las directrices del Sistema Español de Farmacovigilancia.

La notificación rápida, correcta y completa, así como el análisis de la información de seguridad procedente de los estudios clínicos son cruciales para la protección de los sujetos, de los investigadores y del promotor, y así lo requieren las agencias reguladoras a nivel mundial.

Durante el transcurso de cada visita se preguntó a los participantes de forma abierta sobre los cambios en su estado de salud desde la última visita.

Se consideró como acontecimiento o efecto adverso, ya pudiera estar relacionado con el tratamiento evaluado en este estudio o no:

- cualquier signo o síntoma desfavorable no intencionado,
- una nueva enfermedad o el deterioro de una enfermedad preexistente,
- una alteración clínicamente relevante en los valores analíticos (hematológico, bioquímico, etc.) o en el resto de pruebas que se les realizó.

Es importante destacar que esta definición incluyó tanto los accidentes o efectos adversos como las razones para que el participante:

- cambiara el tratamiento (tratamiento y/o dosis),

- visitara, fuera de las citas programadas, al médico, enfermero/a u otro miembro del personal sanitario,
- ingresara en un hospital,
- fuera intervenido quirúrgicamente de forma no prevista.

Se consideró como acontecimientos o efectos adversos graves:

- la muerte,
- la incapacidad/invalidez importante o permanente,
- la hospitalización o prolongación de la misma,
- el riesgo para la vida del participante,
- cáncer,
- la intervención médica o quirúrgica para evitar una alteración funcional o lesión permanente del organismo.

También se consideraron acontecimientos o efectos adversos graves, aquellas situaciones que requirieran utilizar el criterio médico y científico para decidir si podían ser perjudiciales para el participante o requirieran intervención para prevenir uno de los puntos anteriormente citados.

Un acontecimiento adverso que cumpliera con alguno de estos criterios fue considerado grave, independientemente de la dosis administrada del tratamiento y de si el acontecimiento fue consecuencia de una interacción.

Se consideró como acontecimientos o efectos adversos inesperados a aquellas experiencias no descritas (en naturaleza, gravedad o frecuencia) en el manual del investigador.

Se consideró que un acontecimiento o efecto adverso estaba relacionado con la utilización del tratamiento administrado si su causalidad era altamente probable, probable, posible o condicional (este último dependía de diversos aspectos a evaluar) de acuerdo con la clasificación de Karch y Lasagna:

- **Altamente probable**

- Existe una secuencia temporal razonable en relación con la administración del tratamiento o con los niveles plasmáticos o tisulares del mismo.
- La manifestación observada coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas del tratamiento implicado.

- Mejora al interrumpir la administración del tratamiento.
- Reaparece al administrarlo de nuevo.
- **Probable**
 - Secuencia temporal razonable.
 - Coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas.
 - Mejora al interrumpir la administración del tratamiento.
 - No se explica por la situación clínica del sujeto.
- **Posible**
 - Secuencia temporal razonable.
 - Coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas.
 - La reacción mejora o no tras la retirada del tratamiento.
 - Puede ser debida a la situación clínica del sujeto o a otros fármacos o tratamientos administrados concomitantemente.
- **Condicional**
 - Secuencia temporal razonable.
 - No coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas.
 - No puede ser explicada por la situación clínica del sujeto.
- **No relacionada**
 - No cumple ninguno de los criterios mencionados.

Los acontecimientos o efectos adversos durante la realización del estudio, debían ser recogidos por los investigadores en el CRD de cada participante y referidos por el propio sujeto en la hoja de registro de acontecimientos adversos (**Anexo 5**). En dichos documentos se debía describir el acontecimiento o efecto adverso en sí, sus síntomas/signos, duración, intensidad, frecuencia y relación de causalidad entre el tratamiento y el acontecimiento o efecto adverso.

1. La duración hizo referencia al tiempo transcurrido desde la aparición del acontecimiento hasta su finalización.
2. La intensidad se definió según una escala de tres graduaciones:

- leve: momentánea, tolerada por el sujeto.
- moderada: interfiere con la actividad normal del sujeto.
- severa: imposibilita la actividad normal del sujeto.

3. La frecuencia se definió como: puntual, recurrente o persistente.

La relación de causalidad, según se describe anteriormente en la clasificación de Karch y Lasagna.

Todos los acontecimientos adversos, independientemente de su grado de gravedad, de su intensidad o de su presunta relación con el tratamiento en estudio, fueron registrados en los documentos fuente y en el CRD utilizando una terminología médica. Además, se tenía que proporcionar los diagnósticos cuando los signos y los síntomas se debieran a una etiología común (ej. tos, rinorrea, estornudos, dolor de garganta y congestión de la cabeza se notificaría como “infección del tracto respiratorio superior”). Los investigadores debían anotar en el CRD su opinión sobre la relación del acontecimiento adverso con el tratamiento en estudio. Y se tenía que registrar en los documentos fuente todas las medidas requeridas para el tratamiento de los acontecimientos adversos y notificarlo de acuerdo con las instrucciones que figuran en el CRD. Así mismo, también se debía registrar la evolución de los mismos.

El promotor asumió la responsabilidad de notificar, de la forma conveniente, los acontecimientos o efectos adversos a las autoridades legales. El promotor también debía notificar al investigador todos los acontecimientos adversos graves no descritos, y asociados a la administración del tratamiento. Y a su vez, el investigador y/o el promotor debían notificar los acontecimientos graves e inesperados que podían estar relacionados con los tratamientos en investigación a los CEIC y a las CCAA involucradas en el ensayo clínico.

En caso de aparición de un acontecimiento o efecto adverso, se debían tomar las medidas de soporte necesarias para la recuperación y el mantenimiento, dentro de la normalidad, de las constantes vitales del sujeto.

Además, en todas las visitas se evaluó la tolerancia al consumo del tratamiento asignado de los participantes, aplicando un cuestionario que contenía preguntas acerca de si padecían alguno de los siguientes síntomas/signos (**Anexo 9**):

- Náuseas
- Acidez
- Estreñimiento
- Diarrea
- Distensión abdominal
- Halitosis

3.12. EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA A LOS HáBITOS DIETÉTICOS Y AL ESTILO DE VIDA.

A todos los participantes se les informó por escrito y verbalmente, en cada una de las visitas realizadas durante el estudio, que debían mantener sus hábitos dietéticos y estilo de vida en general. La dieta, el hábito tabáquico, el consumo de alcohol, el consumo de medicamentos, la actividad física, etc. de cada participante del estudio se registró en su CRD en cada visita.

Para obtener el conocimiento sobre los hábitos dietéticos de cada participante del estudio y posteriormente, asegurar su mantenimiento durante el mismo, se utilizó:

- Un registro de consumo de alimentos de 72 horas validado (3 días, uno de ellos debía ser festivo), donde el participante tenía que anotar todos los alimentos y bebidas consumidos, dentro y fuera del hogar, a lo largo del día durante tres días de las semanas previas a la V1, V3, V4 y V6. (**Anexo 2**). Los sujetos fueron instruidos para registrar los pesos de los alimentos que consumían cuando fuera posible, y cuando no, utilizar medidas caseras en las cuales se les había también formado. Este registro fue entregado en cada una de las visitas.
- Un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, para conocer el número de raciones consumidas de cada grupo alimentario (**Anexo 3**), el cual fue aportado en cada una de las visitas.

Además, se les proporcionó en la V1 una lista de alimentos antioxidantes de los que no debían incrementar su consumo fuera del habitual (**Anexo 4**).

Todos los registros y cuestionarios fueron revisados en cada visita por un/a nutricionista experimentado/a en estas tareas en presencia del propio sujeto. De esta manera, se aseguraba que la información recogida estuviera completa, a la vez que se verificaba que no hubiese olvidos en los registros. Esta información, aparte de aportar el conocimiento anteriormente citado, permitió evaluar el consumo de alimentos ricos en antioxidantes por parte de los voluntarios, y ver si se cumplía el requisito de no variar su consumo fuera del habitual.

Para calcular el número de raciones consumidas por el participante de cada grupo alimentario, se dividió los gramos consumidos por el correspondiente tamaño de la ración. Para ello, el equipo se basó en los tamaños de raciones medias establecidos en las guías alimentarias para la población española, expuestos en la pirámide de alimentación elaborada por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (SENC 2016; SENC 2004). En el caso de los alimentos preparados, se calcularon los gramos y raciones de cada uno de sus ingredientes y se les asignó al grupo alimentario correspondiente.

Posteriormente, los alimentos fueron transformados en energía y macro y micronutrientes utilizando el software profesional DIAL para valoración de dietas y cálculos alimentarios (Alce Ingeniería, Rozas, Madrid, España) (Ortega et al. 2013).

El consumo de medicamentos o tratamientos concomitantes y cigarrillos fue registrado diariamente por cada participante del estudio, a través de las hojas de registro y cuestionarios entregados en las diversas visitas (**Anexos 5, 6 y 7**). Estos registros y cuestionarios tenían que ser entregados debidamente cumplimentados en la siguiente visita, donde eran revisados y anotados en el CRD de cada participante por los investigadores.

3.13. MEDICIONES DE LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Las medidas antropométricas fueron tomadas al principio y al final de cada periodo de intervención, siguiendo las técnicas estandarizadas de la OMS (WHO 1995; WHO/FAO

1976). Todas las mediciones antropométricas fueron realizadas por personal cualificado, por la mañana y con el sujeto descalzo y vestido sólo con ropa interior.

PESO

El peso corporal fue expresado en kilogramos y se midió mediante una báscula digital de uso clínico (capacidad 0–150 kg). Dicho pesaje se realizó con la persona posicionada de espalda al visor, con los talones juntos, la mirada hacia el frente y la postura corporal recta.

ALTURA

La medición de la altura se realizó mediante un tallímetro de precisión milimétrica (rango: 80-200 cm, precisión de 1 mm), con la persona posicionada de espalda al mismo, los talones juntos, la mirada hacia el frente y la postura corporal recta.

ÍNDICE DE MASA CORPORAL

El índice de masa corporal (IMC) se calculó mediante la fórmula [peso (kg) / altura (m²)] y según el cual se clasificó a los participantes en bajopeso (IMC <18,5 kg/m²), normopeso (IMC ≥18,5 kg/m² y <25 kg/m²) y sobrepeso (IMC ≥25 kg/m² y <30 kg/m²). No fue incluido en el estudio ningún sujeto con obesidad (IMC ≥30 kg/m²).

CIRCUNFERENCIA DE LA CINTURA

La medida de la circunferencia de la cintura se tomó en el punto más estrecho entre la última costilla y la cresta ilíaca, con la cinta pegada a la piel pero sin comprimir. Se mantuvo al sujeto en posición erguida, repartiendo el peso equitativamente en ambas piernas y con los brazos relajados a los costados del cuerpo.

IMPEDANCIA BIOELÉCTRICA

La composición corporal se determinó mediante la técnica de impedancia bioeléctrica (BIA, *siglas en inglés*), para la cual se empleó el analizador multifrecuencia de composición corporal EFG ElectroFluidGraph analyzer (Akern s.r.l., Pontassieve, Florencia, Italia).

La BIA es un método para el estudio de la composición corporal que se basa en la naturaleza de la conducción de la corriente eléctrica a través de tejidos biológicos. Es rápido, portátil, no invasivo, barato y con poca dificultad técnica. También es seguro debido a que usa una frecuencia de 50 kHz, la cual no es suficiente para estimular los tejidos eléctricamente excitables. La corriente es imperceptible y no se han comunicado eventos desfavorables. Este método mide la impedancia u oposición al flujo de una corriente eléctrica a través de los líquidos corporales contenidos fundamentalmente en los tejidos magro y graso. La impedancia es baja en el tejido magro, donde se encuentran principalmente los líquidos intracelulares y los electrólitos, y alta en el tejido graso. En la práctica, una pequeña corriente constante, típicamente de 800 μA a una frecuencia fija, usualmente 50 kHz, se pasa entre electrodos atravesando el cuerpo y la caída de voltaje entre los electrodos proporciona una medida de impedancia.

Las ecuaciones de predicción, generadas previamente correlacionando las medidas de impedancia contra una estimación independiente del agua corporal total, se usan posteriormente para convertir la impedancia medida en una estimación correspondiente del agua corporal total. La masa corporal magra se calcula entonces desde esta estimación usando una fracción de hidratación supuesta para el tejido magro. Y la masa grasa se calcula como la diferencia entre el peso corporal y la masa corporal magra.

El análisis bioeléctrico con el EFG utiliza una corriente sinusoidal de 50 KHz de frecuencia. El valor de la corriente es mantenido de forma constante a 300 microamperios sobre cargas de 1 a 5000 ohms.

Para saturar el organismo con la corriente, los inductores son posicionados distancialmente en la línea metacarpal y metatarsal a través de electrodos de superficie. Los sensores (pinzas negras) son unidos a través de electrodos a las articulaciones de la muñeca y del tobillo, y por tanto en el interior del campo eléctrico.

Para reducir las variaciones que se pudieran producir, es necesario que las medidas de resistencia y reactancia sean ejecutadas bajo condiciones bien controladas en términos de temperatura corpórea, grado de hidratación, posición del cuerpo y concentración sérica de electrolitos, pues éstas podrían influir en los resultados. Para muchos autores la estandarización de la técnica BIA es un aspecto fundamental para la validez de las estimaciones.

Las condiciones impuestas a los participantes para garantizar la fiabilidad de la medición fueron:

- Posición supina sobre superficie no conductora.
- Miembros en abducción de 45°.
- Temperatura de la habitación a 20-22 °C.
- Ayuno de más de 2 horas.
- Sin ejercicio vigoroso en las 24 horas previas.
- No ingesta de alcohol, café, refrescos con cafeína, chocolates en las 24 horas previas.
- No estar en el periodo menstrual y no coincidir con los 3 días que anteceden al mismo.
- No utilizar durante la prueba accesorios de metal: pendientes, cadenas, pulseras, etc.

Los participantes del estudio fueron informados de forma oral y por escrito del protocolo que debían seguir para la realización de esta prueba.

3.14. MEDICIONES DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Se llevaron a cabo 4 extracciones sanguíneas durante el estudio (V1, V3, V4 y V6). Las muestras de sangre fueron obtenidas a primera hora de la mañana, con el sujeto en ayunas (12 h) y por punción venosa (fosa antecubital). Su extracción se realizó en el Centro de Extracciones del HULP por personal de enfermería. Las muestras se conservaron a 4-6°C hasta su análisis, que siempre se realizó dentro de un periodo de 48 horas. Además se recogió una alícuota de 1 ml suero para ser almacenada a - 80 °C en el biobanco del IdiPAZ, para posteriores análisis en caso de ser necesaria su utilización.

Se midieron diferentes biomarcadores del estado oxidativo, del estado inflamatorio, del metabolismo glicémico y lipídico, y de seguridad.

Los análisis de las muestras fueron realizados por la Unidad de Bioquímica y el Servicio de Cirugía Experimental del HULP.

3.14.1. MEDICIONES DE LAS VARIABLES METABÓLICAS Y DE LOS MARCADORES DE SEGURIDAD

Tanto las variables del metabolismo glicémico y lipídico [glucosa basal, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (cLDL), lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y triglicéridos] como los niveles de ALT, AST, creatinina y urato fueron determinadas en sangre mediante un método enzimático-espectrofotométrico utilizando el analizador automático Olympus Diagnostics AU 5400 (Beckman Coulter, Nyon, Suiza).

3.14.2. MEDICIONES DE LAS VARIABLES DEL ESTADO OXIDATIVO

cLDLox

Para cuantificar de forma directa los niveles séricos de cLDLox se utilizó una técnica de inmunoensayo enzimático (ox-LDL ELISA Kit, Immundiagnostic AG, Stubenwald-Allee, Bensheim, Alemania), la cual reconocía la apolipoproteína B100 modificada por malondialdehído. Para la realización de esta técnica se añadieron 100 µL de la solución del estándar, del control y de la muestra a sus respectivos pocillos en microplacas recubiertas con anticuerpos de cLDLox de alta afinidad. Durante el primer periodo de incubación [1 hora a temperatura ambiente (18-26°C)], los anticuerpos de las cLDLox inmovilizados en las paredes de los pocillos capturaron a los antígenos de dichas moléculas existentes en el estándar y en la muestra. Después de lavar las sustancias no unidas, se añadieron 100 µL de un anticuerpo conjugado con peroxidasa a cada pocillo y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación y de los lavados requeridos, se añadieron 100 µL a cada pocillo de tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato de la peroxidasa. Tras un periodo de incubación de 10-20 min en una habitación oscura a temperatura ambiente, se añadieron 100 µL de una solución de parada para terminar la reacción. Finalmente, se determinó la densidad óptica de cada pocillo usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm. La intensidad del color amarillo fue directamente proporcional a la concentración de cLDLox de la muestra. Se generó una curva dosis-respuesta de la unidad de absorbancia frente a la concentración, utilizando los valores obtenidos del estándar. Los niveles de cLDLox presentes en la muestra del sujeto se determinaron directamente a partir de esta curva. El coeficiente de variación intraensayo de esta técnica está entre 3,9-5,7% y el coeficiente de variación interensayo entre 9,0-11,0%. Los valores obtenidos en este estudio se expresan en ng/mL.

TBARS

Los niveles séricos de peróxidos lipídicos se obtuvieron utilizando el método de determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Yagi 1998). Esta técnica proporciona la cantidad total de hidroperóxidos lipídicos y de aldehídos lipídicos derivados de los mismos. La técnica se llevó a cabo añadiendo 20 μL de plasma a un tubo de centrifuga de cristal y 4 mL de ácido sulfúrico 12N (H_2SO_4), los cuales fueron mezclados posteriormente. Después se agregó 0,5 mL de ácido fosfotúngstico al 10% ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y se volvió a mezclar. Tras dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugó a 1.600 g durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se mezcló el sedimento con 2 mL de H_2SO_4 12N y 0,3 mL de $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ al 10%. Dicha mezcla fue centrifugada a 1.600 g durante 10 min. El sedimento se suspendió en 4 mL de agua destilada y se añadió 1 mL de reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBA, *siglas en inglés*). La mezcla de reacción fue calentada a 95°C durante 60 min en un baño de aceite. Después se enfrió con agua corriente y se añadieron 5 mL de n-butanol, agitando la mezcla vigorosamente. Se volvió a centrifugar a 1.600 g durante 15 min y se cogió la capa de n-butanol para la medición fluorométrica a 553 nm (con excitación a 515 nm). La intensidad de fluorescencia de la solución estándar se comparó con la obtenida de la muestra. La peroxidación de lípidos se expresa en este estudio como micromolar equivalente de malondialdehído ($\mu\text{Meq.MDA}$).

FRAP

La capacidad antioxidante del plasma se obtuvo utilizando el método de determinación de la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP, *siglas en inglés*) (Benzie & Strain 1996). Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir la forma férrica (Fe_3^+), presente en un complejo con 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), hasta la forma ferrosa (Fe_2^+). A bajo pH, el Fe_3^+ del complejo se reduce a Fe_2^+ , provocando la formación de un complejo coloreado ($\text{Fe}_2^+\text{-TPTZ}$). Este complejo presenta un máximo de absorbancia a 590-595 nm. En esta técnica se utilizó un reactivo que contenía un tampón acetato (pH 3.6), TPTZ y FeCl_3 . Para llevar a cabo la técnica se utilizaron 900 μL de esta solución, 50 μL de la solución de la muestra y 50 μL de agua destilada. Tras 60 min de reacción se determinó la absorbancia a 593 nm. Los valores de FRAP se obtuvieron comparando el cambio de absorbancia de la solución de la muestra con aquella que contenía iones ferrosos en concentraciones conocidas (estándar). Para la lectura de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-640 (Beckman

Instruments Inc, Fullerton, CA, EE.UU.). Los valores obtenidos se expresan en este estudio en micromolar equivalente de Trolox ($\mu\text{Meq.T}$).

PON-1

La concentración sérica de paraoxonasa 1 (PON-1), la cual es una enzima con un importante papel en la prevención de la oxidación de las cLDL, se determinó utilizando el kit de inmunoensayo enzimático Human serum paraoxonase 1 (PON-1) ELISA kit, No: SK00141-01 (Aviscera Bioscience, Santa Clara, CA, EE.UU.). Para esta prueba se emplearon microplacas recubiertas con un purificado anticuerpo monoclonal anti-IgG de la PON-1. A estas microplacas se añadieron 100 μL de la solución del estándar, del control y de la muestra a sus correspondientes pocillos, dejándolas posteriormente incubar durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C). Tras eliminar por lavado las sustancias no unidas, se añadieron 100 μL de un anticuerpo purificado policlonal anti-IgG específico de la PON-1 y se dejó incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de eliminar por lavado los compuestos no unidos, se añadieron 100 μL de un conjugado de anti-IgG de conejo y HRP, y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Tras los lavados correspondientes, se añadieron 100 μL de la solución del substrato a los pocillos, dejándolos incubar menos de 1 min protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó la solución de parada para detener la reacción. Una vez detenido el desarrollo del color, el cual se generó en proporción a la cantidad de PON-1 existente en la muestra, se determinó la densidad óptica de cada pocillo a los 15 min, usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm. La técnica tiene un coeficiente de variación intraensayo entre 4-6% e interensayo entre 8-12%. La concentración de PON-1 se expresa en el presente estudio en ng/mL.

8-ISOPROSTANOS

En la determinación cuantitativa de los niveles séricos de 8-isoprostanos (8-iso-PGF_{2 α}) se utilizó el kit de inmunoensayo competitivo OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F_{2 α} ELISA Kit (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, EE.UU.). Para la realización de la técnica se pre-recubrieron las microplacas con un anticuerpo específico de 8-iso-PGF_{2 α} . Tras realizar una incubación de 1 hora a temperatura ambiente (25°C) y llevar a cabo los correspondientes lavados, se combinaron 55 μL de la solución del estándar o 55 μL de la solución de la muestra con 55 μL de un conjugado (8-iso-PGF_{2 α} -HRP) en un microtubo y se mezclaron bien. Posteriormente, se transfirieron 100 μL de cada una de las soluciones combinadas a sus

respectivos pocillos. Después de un periodo de incubación de 1 hora a temperatura ambiente y de realizar los correspondientes lavados, se añadieron 100 μL del sustrato de HRP y se volvió a dejar incubando durante 10-30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió una solución de parada (100 μL a cada pocillo) para frenar la reacción. La absorbancia de cada pocillo se leyó en un lector de placas ajustado a 450 nm. La absorbancia fue directamente proporcional a la cantidad de 8-iso-PGF_{2 α} conjugado unido a la placa e inversamente proporcional a la cantidad de 8-iso-PGF_{2 α} libre en la muestra o estándar. El contenido de 8-iso-PGF_{2 α} se calculó comparando los valores obtenidos en la muestra con los obtenidos en el estándar. Los valores obtenidos se expresan en el presente estudio en ng/mL.

NO(x)

Los niveles séricos de nitratos y nitritos [NO(x)] se determinaron utilizando el kit de ensayo colorimétrico Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, No.760871 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE.UU.) de acuerdo con el método de Griess (Ricart-Jane et al. 2002). El óxido nítrico (NO, *siglas en inglés*) es una molécula extremadamente inestable que se une al oxígeno para dar lugar principalmente a dos productos: los nitratos (NO₃⁻) y los nitritos (NO₂⁻). Los NO₃⁻ y NO₂⁻ en sangre y orina son sus metabolitos estables y se utilizan como marcadores de la cuantía de su síntesis endógena. El método de Griess es una técnica simple (espectrofotométrico, 540 nm) para el análisis de NO₂⁻ en soluciones acuosas (Ricart-Jané et al. 2002). Para llevar a cabo esta técnica se añadieron 200 μL de agua o tampón del ensayo a los pocillos control de la placa, a los cuales no se añadió ningún reactivo durante la misma. Posteriormente, se añadieron 40 μL de la muestra a los pocillos correspondientes, ajustando el volumen final hasta 60 μL usando la solución tampón del ensayo. Después se agregaron a los pocillos asignados al estándar y a la muestra, 10 μL de la solución de NADPH y 10 μL de la mezcla de nitrato reductasa y se dejaron incubando durante 1 hora en una habitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 10 μL del cofactor y 10 μL de la solución de lactato deshidrogenasa (LDH) y se volvió a dejar incubando durante 20 min a temperatura ambiente. Después, se añadieron 50 μL del reactivo Griess R1 (No.780018) y 50 μL del reactivo Griess R2 (No. 780020), y se dejó que se desarrollará el color de la reacción durante 10 min. Finalmente, se leyó la absorbancia a 540 nm o 550 nm usando un lector de placas. Los niveles obtenidos se expresan en el presente estudio en micromolar (μM).

3.14.3. MEDICIONES DE LAS VARIABLES DEL ESTADO INFLAMATORIO

PROTEINA C REACTIVA ULTRASENSIBLE

Las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) se determinaron mediante el método de inmunonefelométrico en el nefelómetro BN™ II System (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Hessen, Alemania). Los valores obtenidos en este estudio se expresan en mg/L.

FIBRINÓGENO

Para la cuantificación del fibrinógeno en suero se empleó el método coagulométrico para tiempo de protrombina y se analizó mediante el coagulómetro automatizado ACL TOP 700 (Werfen Group, Barcelona, España). Los valores obtenidos en el presente estudio se expresan en mg/dL.

INTERLEUCINA 6

Las concentraciones plasmáticas de interleucina 6 (IL-6) se determinaron utilizando el analizador de perfiles multianálito Luminex®200™ y el kit de inmunoensayo HCYTOMAG-60K Milliplex Map Kit (MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, EMD Millipore Corp, Billerica, MA, EE.UU.). Los datos fueron analizados utilizando el software 3.1 xPONENT (Millipore). La técnica tiene un coeficiente de variación intra e interensayo del 5 y 10%, respectivamente. La mínima concentración detectable es de 0,9 pg/mL. Los valores obtenidos en este estudio se expresan en pg/mL.

MOLÉCULA DE ADHESIÓN VASCULAR CELULAR 1 SOLUBLE

Para la cuantificación de las concentraciones séricas de la molécula de adhesión celular vascular 1 soluble (sVCAM-1, *siglas en inglés*) se utilizó el analizador de perfiles multianálito Luminex®200™ y el kit de inmunoensayo HCVD2MAG-67K Milliplex Map Kit (MILLIPLEX MAP Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 2, EMP Millipore Corp, Billerica, MA, EE.UU.). Los datos fueron analizados utilizando el software 3.1 xPONENT (Millipore). Para esta técnica se añadieron 100 µL del tampón de ensayo a cada pocillo de la placa y se dejó decantándose durante 10 min a temperatura ambiente (20-25°C). Tras ese tiempo, se retiró la cantidad residual y se añadieron 25 µL de la solución del

estándar, del control y de la muestra a sus respectivos pocillos, junto a 25 μ L de microesferas magnéticas. Posteriormente, se dejó incubando 16-18 horas a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y los lavados requeridos, se añadieron 50 μ L del anticuerpo de detección biotinilado a los pocillos correspondientes y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se agregó, a los pocillos que contenían los anticuerpos, 50 μ L de estreptavidina-ficoeritrina y se volvió a dejar la placa incubando a temperatura ambiente durante 30 min. Por último, tras los lavados pertinentes y una vez añadido 150 μ L del fluido de recubrimiento, se leyó la placa en el analizador multianálito Luminex®200™. La técnica tiene un coeficiente de variación intraensayo e interensayo <15% y <20%, respectivamente. Los valores obtenidos en el presente estudio se expresan en pg/mL.

3.15. MEDICIONES DE LA FUNCIÓN VASCULAR

PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA

La presión arterial y la frecuencia cardiaca se midieron en el brazo derecho usando el monitor automático Spot Vital Signs 420 (Welch Allyn, Madrid, España) (con una precisión de \pm 5 mmHg). Se realizaron tres mediciones consecutivas en intervalos de tiempo de 5 min y se calcularon sus medias.

DILATACIÓN MEDIADA POR FLUJO DE LA ARTERIA BRAQUIAL

La vasodilatación mediada por flujo (DMF) de la arteria braquial se utilizó como indicador de la función endotelial. Las mediciones se realizaron por personal altamente cualificado perteneciente al Servicio de Medicina Interna del HULP, de acuerdo con las recomendaciones formuladas en las directrices publicadas (Corretti et al., 2002). Para la medición de la DMF se utilizó el equipo de ultrasonidos Doppler Biosound MyLab 25 equipado con una sonda lineal de 10 MHz (Esaote, Génova, Italia).

Esta prueba se basa en la liberación endotelial de NO y otros factores relajantes derivados del endotelio, en respuesta a un aumento de la fuerza de cizallamiento tangencial. En esta prueba, esto se produce cuando el flujo sanguíneo del antebrazo aumenta durante la hiperemia reactiva que sigue a un breve periodo de isquemia transitoria en los territorios distales. La isquemia se produce mediante un manguito neumático, colocado en el antebrazo, distalmente a la zona de visualización mediante ecografía, e hinchado a una

presión suprasistólica de 250 mmHg durante 5 min. Al deshinchar el manguito, el aumento del flujo da lugar a una fuerza tangencial, que activa la eNOS para que libere NO a través de la vía de la L-arginina. El NO se difunde a las células del músculo liso y causa su relajación, lo que conduce a vasodilatación. Finalmente, se mide la DMF como el porcentaje de cambio del diámetro de la arteria entre la situación basal y la situación postisquémica (aumento máximo del diámetro arterial).

Para realizar de forma óptima la prueba, el sujeto debía cumplir con una serie de requisitos previos a la misma (guardar un mínimo de 12 horas de ayuno y no realizar ejercicio físico moderado o intenso, ni consumir tabaco, alcohol, café, refrescos con cafeína en las 24 horas anteriores a la prueba, etc.). Después de comprobar que se habían cumplido esos requisitos, el sujeto era colocado en decúbito supino en la camilla de una habitación con una temperatura ambiente estable (20-22°C). Posteriormente, se situaba el brazo derecho del sujeto en supinación, extendido y abducido unos 60°, y se fijaba dicho brazo. En el brazo ya fijado, se colocaba un manguito de presión de 15 cm con barómetro de mercurio bajo la axila. Después se situaba la sonda del equipo de ultrasonidos Doppler justo por encima del pliegue del codo, en una sección longitudinal con marcaje cutáneo y siguiendo referencias anatómicas para garantizar la misma sección en las posteriores mediciones. Tras un periodo de reposo de 10 min, se le medía al sujeto el diámetro arterial en reposo (t0). Posteriormente, se inducía una isquemia (durante 5 min) inflando el manguito a una presión de 250 mmHg. Tras dicho periodo de tiempo, se procedía a desinflar el esfigmomanómetro y a registrar, a los 70 segundos de la liberación de la isquemia, el diámetro arterial postisquemia (td). Todas las imágenes generadas fueron capturadas por el mismo operador en el pico sistólico de la curva Doppler. Las mediciones se realizaron por triplicado y se utilizó el dato medio. Con los datos recogidos se determinó el área bajo la curva (AUC, *siglas en inglés*) para t0 y td. Y la DMF fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$DMF = (AUC_{td} - AUC_{t0}) * 100 / AUC_{t0}.$$

Se diagnosticó disfunción endotelial (DE) en caso de presentar una DMF menor al 10% (Kuvín et al. 2001).

3.16. ESTRATOS DE LA POBLACIÓN TOTAL SEGÚN DIVERSOS FRCV

En el presente estudio se estratificó, al inicio del estudio, a la población total por diversos FRCV, entre los que destacamos en esta tesis doctoral los FRCV emergentes. Esto es debido a que en los últimos años, los FRCV emergentes como la DE (Gutiérrez et al. 2013; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001; Ribeiro et al. 2009) y los niveles circulantes elevados de cLDLox (Trpkovic et al. 2015) han adquirido una gran relevancia a causa de su importante papel en la patogenia de la Aterosclerosis.

Estos FRCV emergentes son considerados predictores del riesgo de sufrir eventos CV, incluso en sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos (Shechter et al. 2014; Shechter et al. 2009; Corrado et al. 2008; Meisinger et al. 2005; Holvoet et al. 2004; Holvoet et al. 2003).

Los puntos de corte establecidos para los FRCV emergentes fueron:

- DMF valores $\geq 10\%$ (función endotelial normal) o $< 10\%$ (disfunción endotelial) (Kuvín et al. 2001).
- cLDLox valores $\leq 131,9$ ng/mL (niveles circulantes normales de cLDLox) o $> 131,9$ ng/mL (niveles circulantes elevados de cLDLox), utilizando como punto de corte el percentil 75 de la población del estudio (P_{75}).

Además, por la importancia de los resultados observados se incluye en esta tesis doctoral los datos de la población estratificada en función de la presión arterial, tanto en función de PAS (normotensión sistólica: < 120 mmHg, preHTA/HTA sistólica: ≥ 120 mmHg) como de PAD (normotensión diastólica: < 80 mmHg, preHTA/HTA diastólica: ≥ 80 mmHg).

3.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cálculo del tamaño muestral se consideró como variable principal la DMF, una potencia del 90% ($\alpha=0,05$), una posible tasa de abandono del 20% y una diferencia absoluta relevante del 2% en el DMF (Sorensen et al. 1995). El resultado del cálculo del tamaño muestral fue de 38 sujetos.

Los datos cuantitativos en la presente tesis se presentan como medias e intervalos de confianza del 95% (IC_{95%}). Los datos cualitativos se presentan como números y porcentajes. Todas las variables fueron sometidas a las pruebas de distribución de normalidad y homogeneidad de la varianza, usando los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Cuando fue necesario, las variables de respuesta fueron transformadas logarítmicamente para normalizarlas.

Se utilizó para el análisis estadístico un Modelo Mixto. Para la estimación de los parámetros se empleó el método de estimación por máxima verosimilitud restringida (REML, *siglas en inglés*) y para la obtención de los grados de libertad el método Satterthwaite. Se consideraron para el modelo principal (diferencias) como efectos fijos de tipo clase el tratamiento, el periodo, la interacción tratamiento x periodo, el riesgo y la interacción tratamiento x riesgo, y como covariable el momento basal en cada periodo. Como efecto aleatorio, el sujeto anidado en la secuencia y con estructura de covarianza “componentes de la varianza”. Se estimaron y compararon para este modelo principal los valores medios de la respuesta “por tratamiento y por la interacción tratamiento x riesgo”.

Por otro lado, para el modelo secundario (inicio-fin) se consideraron como efectos fijos de tipo clase las variables inicio-fin, el tratamiento, la interacción inicio-fin x tratamiento, el periodo, la interacción tratamiento x periodo, la interacción inicio-fin x tratamiento x periodo, el riesgo, la interacción tratamiento x riesgo y la interacción inicio-fin x tratamiento x riesgo. Como efecto aleatorio para este modelo, el sujeto anidado en la secuencia y con estructura de covarianza “componentes de la varianza”. Se estimaron y compararon para el modelo secundario los valores medios de la respuesta en las variables “interacción tratamiento x inicio-fin, e inicio-fin x tratamiento x riesgo”.

Se evaluó los efectos globales con el error tipo III, en particular, la estimación del efecto residual que se definió como la interacción “periodo x tratamiento”. Si para alguna variable esta interacción fue significativa en el error tipo III, el análisis se consideró únicamente para el primer periodo. Las comparaciones múltiples se corrigieron con el método de Bonferroni.

Todas las pruebas estadísticas se consideraron bilaterales y como valores significativos aquellos con una p inferior a 0,05. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS® 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS

RESULTADOS

Tabla 1. Características basales generales de la población.

		Placebo/SAX	SAX/Placebo	P
		(n=33)	(n=34)	
Sexo	(% Mujeres)	78,79	79,41	NS
Edad	(años)	53,21 (51,74-54,69)	52,79 (51,13-54,46)	NS
Fumar	(% Fumadores)	18,20	26,50	NS
Alcohol	(%*)	39,39	50,00	NS
Datos expresados en medias o porcentajes (IC95%). NS: No Significativo. * No abstemios que consuman <30 g/día.				

Tabla 2. Características basales dietéticas de la población.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
Energía	(kcal)	1908 (1692-2125)	1929 (1687-2171)	NS
Hidratos de Carbono	(%)	37,09 (34,36-39,82)	37,64 (33,93-41,35)	NS
Proteínas	(%)	17,79 (16,55-19,03)	17,42 (15,72-19,11)	NS
Lípidos	(%)	41,48 (38,21-44,76)	41,85 (38,54-45,16)	NS
Alcohol	(%)	1,233 (0,307-2,158)	0,773 (0,151-1,395)	NS
AGS	(%)	13,22 (11,57-14,87)	12,84 (11,54-14,13)	NS
AGM	(%)	19,28 (17,20-21,35)	18,70 (16,97-20,43)	NS
AGP	(%)	5,410 (4,707-6,113)	6,728 (5,372-8,085)	NS
Colesterol Total	(mg/d)	326,9 (256,9-396,9)	353,1 (272,2-434,0)	NS
Fibra	(g/d)	22,65 (18,64-26,66)	21,71 (17,63-25,78)	NS
Frutas y verduras	(raciones/d)	3,524 (2,850-4,199)	3,141 (2,537-3,746)	NS
Aceite de Oliva*	(g/d)	13,76 (8,971-18,55)	12,13 (7,364-16,89)	NS

Datos expresados en medias (IC_{95%}). AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados; AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados; Aceite de Oliva*: Aceite de Oliva Virgen. NS: No Significativo.

Tabla 3. Características basales antropométricas y de la composición corporal de la población.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
Peso	(kg)	66,26 (62,07-70,45)	64,08 (60,27-67,90)	NS
IMC	(kg/m ²)	24,64 (23,60-25,68)	24,56 (23,46-25,65)	NS
CCi	(cm)	80,51 (77,26-83,77)	82,58 (79,18-85,98)	NS
MG	(%)	28,98 (26,61-31,35)	28,76 (26,54-30,98)	NS
MLG	(%)	71,02 (68,65-73,39)	71,24 (69,02-73,46)	NS
MM	(%)	48,09 (45,40-50,78)	47,87 (45,94-49,79)	NS

Datos expresados en medias (IC_{95%}). IMC: Índice de Masa Corporal; CCi: Circunferencia de Cintura; MG: Masa Grasa; MLG: Masa Libre de Grasa; MM: Masa Muscular. NS: No Significativo.

Tabla 4. Características basales metabólicas, de seguridad y de la función vascular de la población.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
Glucosa Basal	(mg/dL)	95,72 (92,20-99,24)	99,52 (95,95-103,1)	NS
Colesterol Total	(mg/dL)	226,7 (215,9-237,4)	224,6 (210,7-238,5)	NS
cLDL	(mg/dL)	144,3 (135,6-153,0)	145,3 (134,3-156,2)	NS
cHDL	(mg/dL)	66,25 (61,55-70,95)	62,00 (57,31-66,69)	NS
Triglicéridos	(mg/dL)	80,56 (71,81-89,32)	86,52 (70,37-102,7)	NS
ALT	(UI/L)	21,11 (18,84-23,38)	20,03 (18,14-21,92)	NS
AST	(UI/L)	24,11 (21,92-26,30)	22,86 (21,50-24,22)	NS
FA	(UI/L)	81,28 (74,54-88,02)	80,94 (74,65-87,23)	NS
Creatinina	(mg/dL)	0,935 (0,904-0,967)	0,946 (0,913-0,980)	NS
Urato	(mg/dL)	4,628 (4,350-4,906)	4,605 (4,341-4,868)	NS
PAS	(mmHg)	117,6 (111,1-124,0)	111,2 (106,0-116,3)	NS
PAD	(mmHg)	74,33 (70,51-78,16)	73,75 (70,45-77,05)	NS
FC	(lpm)	68,09 (64,85-71,33)	70,22 (67,63-72,81)	NS
DMF	(%)	8,279 (6,841-9,717)	7,834 (6,508-9,160)	NS
Datos expresados en medias (IC _{95%}). cLDL: Lipoproteína de baja densidad; cHDL: Lipoproteína de alta densidad; ALT: Alanina Aminotransferasa; AST: Aspartato Aminotransferasa; FA: Fosfatasa Alcalina; PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; FC: Frecuencia Cardíaca; DMF: Dilatación Mediada por Flujo. NS: No Significativo.				

Tabla 5. Características basales del estado oxidativo e inflamatorio de la población.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
cLDLox	(ng/mL)	118,2 (65,27-171,2)	103,4 (62,95-143,8)	NS
8-iso-PGF _{2α}	(ng/mL)	58,92 (54,22-63,61)	57,10 (53,45-60,75)	NS
TBARS	(μMeq.MDA)	0,622 (0,338-0,907)	0,572 (0,311-0,834)	NS
FRAP	(μMeq.T)	0,410 (0,389-0,430)	0,424 (0,401-0,448)	NS
PON-1	(ng/mL)	5,777 (3,409-8,145)	4,383 (2,998-5,768)	NS
NO(x)	(μM)	23,28 (19,93-26,63)	27,16 (20,10-34,21)	NS
PCR-us	(mg/L)	1,225 (0,984-1,466)	2,021 (1,090-2,952)	NS
Fibrinógeno	(mg/dL)	373,3 (354,5-392,1)	389,1 (369,7-408,5)	NS
IL-6	(pg/mL)	7,335 (2,398-12,27)	4,433 (1,236-7,629)	NS
sVCAM-1	(pg/mL)	673,4 (604,7-742,2)	659,3 (595,3-723,4)	NS

Datos expresados en medias (IC_{95%}). cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada; 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano; TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico; FRAP: Capacidad de Reducción Férrica del Plasma; PON-1; Paraoxonasa 1; NO(x): Nitratos+Nitritos; PCR-us: Proteína C Reactiva ultrasensible; IL-6: Interleucina 6; sVCAM-1: Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 soluble. NS: No Significativo.

Tabla 6. Características generales de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
Sexo	(% Mujeres)	78,79	79,41	NS
Edad	(años)	53,21 (51,71-54,72)	52,79 (51,13-54,46)	NS
Fumar	(% Fumadores)	18,18	26,47	NS
Alcohol	(%*)	40,27	49,80	NS
Datos expresados en medias o porcentajes (IC _{95%}). NS: No Significativo.* No abstemios que consuman <30 g/día.				

Tabla 7. Características dietéticas de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
Energía	(kcal)	1912 (1756-2068)	1873 (1715-2031)	NS
Hidratos de Carbono	(%)	37,76 (36,04-39,49)	38,77 (35,70-41,84)	NS
Proteínas	(%)	17,44 (16,39-18,49)	17,24 (16,18-18,30)	NS
Lípidos	(%)	41,25 (39,24-43,26)	40,64 (37,81-43,47)	NS
Alcohol	(%)	1,183 (0,654-1,713)	1,058 (0,472-1,644)	NS
AGS	(%)	12,54 (11,47-13,61)	12,25 (11,09-13,41)	NS
AGM	(%)	19,39 (18,11-20,66)	18,52 (17,07-19,97)	NS
AGP	(%)	5,776 (5,283-6,270)	6,260 (5,490-7,029)	NS
Colesterol Total	(mg/d)	337,1 (285,4-388,9)	316,5 (264,5-368,4)	NS
Fibra	(g/d)	22,43 (19,93-24,93)	21,21 (18,69-23,73)	NS
Frutas y verduras	(raciones/d)	3,389 (2,957-3,820)	3,108 (2,714-3,501)	NS
Aceite de Oliva*	(g/d)	14,50 (11,31-17,69)	13,75 (10,65-16,85)	NS

Datos expresados en medias (IC_{95%}). AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados; AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados; Aceite de Oliva*: Aceite de Oliva Virgen. NS: No Significativo.

Tabla 8. Características antropométricas y de la composición corporal de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
Peso	(kg)	66,11 (57,18-75,04)	63,91 (60,31-67,51)	NS
IMC	(kg/m ²)	24,59 (22,15-27,02)	24,51 (23,49-25,54)	NS
CCi	(cm)	81,01 (73,32-88,71)	82,05 (78,75-85,36)	NS
MG	(%)	29,54 (28,34-30,75)	29,12 (28,01-30,23)	NS
MLG	(%)	70,46 (69,25-71,66)	70,88 (69,77-71,99)	NS
MM	(%)	47,09 (45,96-48,22)	47,00 (46,05- 47,95)	NS

Datos expresados en medias (IC_{95%}). IMC: Índice de Masa Corporal; CCi: Circunferencia de Cintura; MG: Masa Grasa; MLG: Masa Libre de Grasa; MM: Masa Muscular; NS: No Significativo.

Tabla 9. Características metabólicas, de seguridad y de la función vascular de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
Glucosa Basal	(mg/dL)	96,79 (90,02-103,6)	99,96 (97,09-102,8)	NS
Colesterol Total	(mg/dL)	222,6 (197,3-247,9)	222,7 (211,8-233,7)	NS
cLDL	(mg/dL)	140,5 (120,0-161,0)	142,8 (133,8-151,8)	NS
cHDL	(mg/dL)	64,75 (55,40-74,11)	61,89 (58,03-65,74)	NS
Triglicéridos	(mg/dL)	86,69 (81,76-91,61)	90,12 (82,88-97,36)	NS
ALT	(UI/L)	21,08 (19,07-23,09)	20,08 (17,92-22,24)	NS
AST	(UI/L)	24,08 (21,91-26,25)	22,91 (21,48-24,34)	NS
FA	(UI/L)	85,08 (77,96-92,20)	77,26 (71,52-83,00)	NS
Creatinina	(mg/dL)	0,941 (0,913-0,969)	0,941 (0,905-0,977)	NS
Urato	(mg/dL)	4,439 (4,213-4,665)	4,788 (4,487-5,089)	NS
PAS	(mmHg)	108,1 (104,9-111,2)	105,4 (102,5-108,2)	NS
PAD	(mmHg)	73,64 (71,38-75,90)	71,41 (69,15-73,66)	NS
FC	(lpm)	67,03 (61,01-73,04)	69,48 (67,16-71,80)	NS
DMF	(%)	8,940 (8,084-9,795)	8,194 (7,366-9,022)	NS

Datos expresados en medias (IC_{95%}). cLDL: Lipoproteína de baja densidad; cHDL: Lipoproteína de alta densidad; ALT: Alanina Aminotransferasa; AST: Aspartato Aminotransferasa; FA: Fosfatasa Alcalina; PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; FC: Frecuencia Cardíaca; DMF: Dilatación Mediada por Flujo. NS: No Significativo.

Tabla 10. Características del estado oxidativo e inflamatorio de la población en función de la secuencia de tratamiento asignada.

		Placebo/SAX (n=33)	SAX/Placebo (n=34)	P
cLDLox	(ng/mL)	114,1 (89,42-138,7)	92,18 (61,30-123,1)	NS
8-iso-PGF _{2α}	(ng/mL)	50,99 (43,32-58,66)	53,19 (50,05-56,33)	NS
TBARS	(μMeq.MDA)	0,655 (0,505-0,805)	0,635 (0,484-0,785)	NS
FRAP	(μMeq.T)	0,419 (0,364-0,474)	0,431 (0,407-0,454)	NS
PON-1	(ng/mL)	4,875 (3,687-6,062)	3,216 (2,507-3,925)	NS
NO(x)	(μM)	24,49 (22,48-26,50)	24,39 (21,52-27,27)	NS
PCR-us	(mg/L)	1,561 (1,304-1,819)	1,958 (1,543-2,373)	NS
Fibrinógeno	(mg/dL)	377,8 (339,3-416,2)	387,5 (372,2-402,8)	NS
IL-6	(pg/mL)	3,450 (1,945-4,956)	2,123 (1,301-2,944)	NS
sVCAM-1	(pg/mL)	643,6 (534,5-752,7)	608,4 (566,1-650,8)	NS

Datos expresados en medias (IC_{95%}). cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada; 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano; TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico; FRAP: Capacidad de Reducción Férrica del Plasma; PON-1; Paraoxonasa 1; NO(x): Nitratos+Nitritos; PCR-us: Proteína C Reactiva ultrasensible; IL-6: Interleucina 6; sVCAM-1: Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 soluble. NS: No Significativo.

Tabla 11. Perfil calórico de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo	SAX
			(n=67)	(n=67)
Energía	(kcal/d)	Inicio	1864 (1715-2013)	1923 (1758-2087)
		Final	1881 (1701-2060)	1891 (1715-2066)
		Cambio	17,07 (-95,14-129,3)	-31,88 (-180,0-116,3)
Hidratos de Carbono	(%)	Inicio	38,46 (35,66-41,26)	38,06 (35,97-40,14)
		Final	39,06 (37,00-41,11)	37,62 (35,59-39,64)
		Cambio	0,598 (-1,949-3,145)	-0,439 (-2,274-1,396)
Proteínas	(%)	Inicio	17,44 (16,53-18,34)	17,24 (16,05-18,43)
		Final	17,60 (16,63-18,57)	17,43 (16,28-18,59)
		Cambio	0,164 (-0,925-1,253)	0,193 (-1,219-1,605)
Lípidos	(%)	Inicio	40,48 (37,70-43,27)	41,42 (39,41-43,44)
		Final	40,19 (38,35-42,04)	41,36 (39,53-43,19)
		Cambio	-0,287 (-2,805-2,231)	-0,067(-1,764-1,631)
Alcohol	(%)	Inicio	1,286 (0,622-1,950)	0,952 (0,541-1,364)
		Final	0,960 (0,556-1,364)	1,268 (0,701-1,836)
		Cambio	-0,326 (-0,941-0,289)	0,316 (-0,263-0,895)
Datos expresados en medias (IC _{95%}).				

Tabla 12. Perfil lipídico y otras características dietéticas de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo	SAX
			(n=67)	(n=67)
AGS	(%)	Inicio	12,46 (11,20-13,73)	12,33 (11,40-13,26)
		Final	12,03 (11,11-12,95)	12,38 (11,49-13,27)
		Cambio	-0,433 (-1,743-0,876)	0,049 (-0,799-0,897)
AGM	(%)	Inicio	18,82 (17,27-20,37)	19,10 (17,95-20,25)
		Final	19,29 (18,20-20,38)	19,56 (18,29-20,83)
		Cambio	0,470 (-0,868-1,808)	0,453 (-0,771-1,677)
AGP	(%)	Inicio	5,596 (5,080-6,111)	6,445 (5,708-7,182)
		Final	5,462 (4,884-6,040)	5,975 (5,436-6,513)
		Cambio	-0,134 (-0,586-0,318)	-0,470 (-1,231-0,290)
Colesterol Total	(mg/d)	Inicio	303,9 (256,5-351,4)	350,5 (295,2-405,7)
		Final	323,0 (286,4-359,5)	328,1 (285,3-370,9)
		Cambio	19,04 (-22,03-60,11)	-22,35 (-89,75-45,05)
Fibra	(g/d)	Inicio	21,71 (19,18-24,23)	21,95 (19,45-24,46)
		Final	20,47 (18,18-22,76)	21,68 (18,84-24,52)
		Cambio	-1,234 (-3,272-0,804)	-0,275 (-2,882-2,332)
Frutas y Verduras	(raciones/d)	Inicio	3,296 (2,874-3,717)	3,196 (2,790-3,602)
		Final	2,966 (2,644 -3,289)	3,327 (2,973-3,682)
		Cambio	-0,329 (-0,686-0,028)	0,131 (-0,195-0,458)
Aceite de Oliva*	(g/d)	Inicio	14,66 (11,59-17,72)	13,69 (10,47-16,90)
		Final	14,94 (11,81-18,08)	12,57 (10,07-15,08)
		Cambio	0,289 (-3,911-4,488)	-1,113 (-3,724-1,499)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados; AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados; Aceite de Oliva*: Aceite de Oliva Virgen.

Tabla 13. Perfil calórico de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial	Función Endotelial	Disfunción Endotelial	Función Endotelial
			(n=47)	Normal (n=20)	(n=47)	Normal (n=20)
Energía	(kcal/d)	Inicio	1908 (1156-3484)	1777 (1150-3432)	2024 (1824-2224)	1734 (1084-2704)
		Final	1940 (1762-2117)	1767 (1159-4112)	1887 (1107-3400)	1897 (1203-3490)
		Cambio	31,91 (-99,96-163,8)	-10,21 (-221,3-200,9)	-137,0 (-314,7-40,81)	163,3 (-100,1-426,7)
Hidratos de Carbono	(%)	Inicio	38,73 (8,734-52,09)	37,92 (22,69-54,12)	38,75 (36,52-40,98)	36,77 (24,91-51,42)
		Final	39,43 (37,13-41,73)	38,33 (28,04-53,40)	37,85 (26,92-48,47)	37,18 (28,12-51,15)
		Cambio	0,695 (-2,697-4,087)	0,411 (-3,802-4,624)	-0,897 (-3,258-1,464)	0,412 (-2,848-3,672)
Proteínas	(%)	Inicio	17,52 (13,47-23,69)	17,28 (13,84-23,23)	16,85 (15,30-18,39)	17,98 (12,32-24,53)
		Final	17,81 (16,57-19,06)	17,18 (12,44-22,30)	17,60 (16,15-19,04)	17,13 (12,52-23,83)
		Cambio	0,298 (-1,108-1,703)	- 0,095 (-2,032-1,843)	0,753 (-1,036-2,541)	-0,846 (-3,361-1,670)
Lípidos	(%)	Inicio	40,60 (27,71-65,85)	40,26 (25,63-61,12)	41,24 (39,14-43,35)	41,76 (27,73-52,80)
		Final	39,57 (37,36-41,77)	41,41 (29,34-51,22)	41,17 (32,48-54,12)	41,71 (30,42-53,37)
		Cambio	-1,032 (-4,152-2,088)	1,149 (-17,67-12,97)	-0,074 (-2,141-1,994)	-0,054 (-3,427--3,320)
Alcohol	(%)	Inicio	0,926 (0,000-7,626)	1,982 (0,000-9,090)	0,927 (0,397-1,457)	1,000 (0,000-3,107)
		Final	1,090 (0,546-1,634)	0,710 (0,000-2,966)*	1,058 (0,344-1,772)	1,659 (0,000-5,725)
		Cambio	0,164 (-0,378-0,707)	-1,272 (-6,124-1,313)	0,131 (-0,481-0,743)	0,660 (-0,659-1,979)+
Datos expresados en medias (IC _{95%}). Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (*p<0,05). Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (+p<0,05).						

Tabla 14. Perfil lipídico y otras características dietéticas de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)	Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)
AGS	(%)	Inicio	12,67 (7,402-24,83)	12,05 (7,701-17,90)	12,25 (11,11-13,39)	12,49 (6,118-18,15)
		Final	11,94 (10,91-12,98)	12,20 (6,501-19,34)	12,11 (8,591-16,85)	12,88 (6,168-19,76)
		Cambio	-0,732 (-2,588-1,123)	0,143 (-5,680-6,151)	-0,138 (-1,326-1,050)	0,397 (-0,794-1,588)
AGM	(%)	Inicio	18,62 (10,89-28,96)	19,21 (11,15-34,46)	18,86 (17,78-19,95)	19,55 (10,88-28,37)
		Final	18,64 (17,26-20,02)	20,54 (15,15-26,64)	19,56 (13,31-30,33)	19,55 (11,83-28,85)
		Cambio	0,027 (-1,496-1,550)	1,324 (-7,818-8,602)	0,697 (-0,852-2,247)	0,001 (-2,259-2,256)
AGP	(%)	Inicio	5,665 (3,228-9,875)	5,462 (3,384-9,076)	6,641 (5,637-7,646)	6,081 (3,652-11,22)
		Final	5,550 (4,715-6,384)	5,292 (4,000-7,792)	6,096 (4,001-12,04)	5,750 (4,132-10,33)
		Cambio	-0,115 (-0,710-0,480)	-0,170 (-0,941-0,601)	-0,545 (-1,660-0,570)	-0,331 (-1,200-0,538)
Colesterol Total	(mg/d)	Inicio	314,9 (112,0-571,0)	282,9 (139,0-823,0)	372,3 (292,7-451,9)	309,9 (127,0-463,0)
		Final	340,8 (296,8-384,7)	288,6 (48,50-574,0)	321,1 (97,10-599,0)	341,1 (131,0-650,0)
		Cambio	25,93 (-17,70-69,55)	5,750 (-89,96-101,5)	-51,19 (-138,8-36,38)	31,21 (-81,50-143,9)
Fibra	(g/d)	Inicio	21,16 (10,40-40,70)	22,76 (10,40-46,00)	21,92 (19,15-24,69)	22,01 (9,000-36,20)
		Final	20,52 (18,30-22,75)	20,37 (9,800-46,10)	21,34 (9,300-42,30)	22,30 (10,30-53,50)
		Cambio	-0,633 (-3,174-1,908)	-2,393 (-6,203-1,417)	-0,581 (-3,814-2,653)	0,293 (-4,725-5,310)
Frutas y Verduras	(raciones/d)	Inicio	3,085 (0,386-7,000)	3,616 (1,429-7,786)	3,129 (0,286-8,000)	3,363 (1,333-7,000)
		Final	2,847 (0,143-6,000)	3,247 (1,429-6,000)	3,075 (0,352-6,000)	3,893 (2,000-6,000)
		Cambio	-0,238 (-0,646-0,170)	-0,369 (-1,153-0,415)	-0,054 (-0,477-0,368)	0,530 (-0,023-1,083)
Aceite de Oliva*	(g/d)	Inicio	14,83 (11,67-17,99)	14,31 (6,688-21,93)	13,11 (9,996-16,22)	14,89 (6,525-23,25)
		Final	13,06 (9,128-16,99)	18,72 (13,47-23,96)	12,12 (9,619-14,61)	13,52 (3,300-36,70)
		Cambio	-1,771 (-7,083-3,541)	4,408 (-2,877-11,69)	-0,993 (-4,479-2,494)	-1,362 (-5,557-2,834)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados; AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados; Aceite de Oliva*: Aceite de Oliva Virgen.

Tabla 15. Perfil calórico de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)	Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)
Energía	(kcal/d)	Inicio	1758 (1571-1944)	1918 (1709-2128)	1990 (1690-2290)	1886 (1677-2095)
		Final	1739 (1625-1854)	1954 (1685-2223)	1954 (1714-2195)	1857 (1608-2105)
		Cambio	-18,43 (-220,9-184,0)	35,48 (-108,2-179,2)	-36,29 (-274,5-201,9)	-29,50 (-229,9-179,2)
Hidratos de Carbono	(%)	Inicio	40,34 (35,49-45,20)	37,48 (33,88-41,08)	38,45 (34,02-42,89)	37,84 (35,44-40,24)
		Final	41,97 (37,91-46,02)	37,55 (35,26-39,83)	37,71 (34,04-41,38)	37,56 (34,96-40,17)
		Cambio	1,625 (-2,469-5,719)	0,066 (-3,341-3,472)	-0,741 (-4,805-3,324)	-0,277 (-2,317-1,764)
Proteínas	(%)	Inicio	18,51 (16,72-20,31)	16,88 (15,84-17,91)	17,94 (16,01-19,87)	16,87 (15,29-18,45)
		Final	17,97 (16,09-19,86)	17,41 (16,22-18,59)	17,84 (15,77-19,91)	17,21 (15,73-18,70)
		Cambio	-0,542 (-2,486-1,401)	0,530 (-0,854-1,914)	-0,093 (-1,767-1,582)	0,347 (-1,711-2,405)
Lípidos	(%)	Inicio	36,86 (32,02-41,70)	42,36 (38,96-45,76)	40,26 (35,50-45,01)	42,05 (40,02-44,09)
		Final	37,36 (33,88-40,83)	41,66 (39,57-43,76)	40,12 (37,07-43,18)	42,02 (39,62-44,42)
		Cambio	0,499 (-3,768-4,766)	-0,695 (-4,007-2,617)	-0,133 (-4,070-3,805)	-0,031 (-1,827-1,764)
Alcohol	(%)	Inicio	1,974 (0,213-3,735)	0,930 (0,403-1,457)	1,023 (0,113-1,933)	0,914 (0,456-1,373)
		Final	0,702 (-0,078-1,481)*	1,094 (0,601-1,587)	2,045 (0,660-3,430)	0,850 (0,372-1,329)
		Cambio	-1,272 (-2,518--0,027)	0,165 (-0,496-0,825)	1,022 (-0,273-2,317)++	-0,064 (-0,645-0,517)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (*p<0,05). Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (++p<0,01).

Tabla 16. Perfil lipídico y otras características dietéticas de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)	Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)
AGS	(%)	Inicio	11,26 (8,961-13,55)	13,09 (11,52-14,65)	11,54 (9,865-13,21)	12,76 (11,60-13,92)
		Final	10,85 (9,468-12,22)	12,64 (11,44-13,84)	11,14 (9,738-12,54)	13,05 (11,93-14,17)
		Cambio	-0,412 (-2,214-1,390)	-0,444 (-2,283-1,394)	-0,399 (-1,437-0,639)	0,291 (-0,929-1,510)
AGM	(%)	Inicio	17,11 (14,71-19,52)	19,71 (17,69-21,72)	18,72 (16,27-21,17)	19,31 (17,99-20,63)
		Final	18,02 (16,04-20,01)	19,95 (18,63-21,27)	19,17 (17,00-21,34)	19,76 (18,09-21,43)
		Cambio	0,911 (-1,629-3,451)	0,241 (-1,427-1,910)	0,456 (-2,066-2,978)	0,451 (-1,001-1,903)
AGP	(%)	Inicio	5,193 (4,255-6,130)	5,804 (5,161-6,448)	6,642 (4,767-8,516)	6,339 (5,666-7,012)
		Final	5,099 (4,529-5,670)	5,650 (4,805-6,495)	6,301 (5,222-7,380)	5,799 (5,159-6,439)
		Cambio	-0,094 (-1,017-0,830)	-0,154 (-0,696-0,387)	-0,340 (-2,280-1,599)	-0,540 (-1,232-0,152)
Colesterol total	(mg/d)	Inicio	288,6 (204,4-372,9)	311,9 (250,6-373,1)	357,7 (253,5-462,0)	346,6 (277,1-416,0)
		Final	332,9 (270,7-395,0)	317,8 (269,8-365,9)	352,9 (296,2-409,5)	314,8 (254,4-375,3)
		Cambio	44,21 (-39,80-128,2)	5,982 (-42,38-54,34)	-4,857 (-118,8-109,1)	-31,77 (-121,0-57,43)
Fibra	(g/d)	Inicio	20,33 (16,58-24,08)	22,42 (18,97-25,87)	22,04 (18,82-25,25)	21,90 (18,30-25,51)
		Final	17,57 (15,66-19,49)	21,97 (18,69-25,26)	22,69 (16,42-28,96)	21,13 (17,98-24,28)
		Cambio	-2,757 (-6,405-0,891)	-0,444 (-3,016-2,128)	0,657 (-4,013-5,328)	-0,777 (-4,129-2,575)
Frutas y Verduras	(raciones/d)	Inicio	3,705 (3,039-4,371)	3,173 (2,607-3,738)	3,763 (3,025-4,501)	3,011 (2,511-3,511)
		Final	3,263 (2,731-3,795)	2,864 (2,440-3,288)	3,771 (3,006-4,535)	3,113 (2,694-3,531)
		Cambio	-0,442 (-1,220-0,337)	-0,308 (-0,740-0,124)	0,007 (-0,704-0,718)	0,102 (-0,260-0,464)
Aceite de Oliva*	(g/d)	Inicio	15,88 (10,14-21,61)	14,05 (10,16-17,94)	16,32 (8,817-23,81)	12,42 (8,991-15,85)
		Final	13,97 (9,368-18,57)	15,43 (11,12-19,75)	14,31 (9,734-18,88)	11,74 (8,588-14,89)
		Cambio	-1,908 (-11,65-7,836)	1,388 (-3,202-5,977)	-2,008 (-7,989-3,973)	-0,682 (-3,593-2,230)
Datos expresados en medias (IC _{95%}). AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados; AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados; Aceite de Oliva*: Aceite de Oliva Virgen.						

Tabla 17. Variables antropométricas y de composición corporal de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo	SAX
			(n=67)	(n=67)
Peso	(kg)	Inicio	65,10 (62,35-67,85)	65,10 (62,35-67,86)
		Final	64,85 (62,10-67,60)	64,93 (62,18-67,68)
		Cambio	-0,249 (-0,494--0,004)	-0,173 (-0,480-0,134)
IMC	(kg/m²)	Inicio	24,63 (23,90-25,36)	24,58 (23,84-25,31)
		Final	24,48 (23,75-25,21)	24,51 (23,79-25,23)
		Cambio	-0,151 (-0,292--0,010)	-0,068 (-0,179-0,042)
CCi	(cm)	Inicio	81,24 (78,86-83,62)	81,85 (79,65-84,06)
		Final	81,24 (78,91-83,59)	81,82 (79,48-84,16)
		Cambio	0,008 (-0,887-0,902)	-0,034 (-0,731-0,663)
MG	(%)	Inicio	28,90 (27,31-30,50)	29,16 (27,56-30,77)
		Final	29,79 (28,04-31,55)*	29,56 (27,89-31,23)
		Cambio	0,891 (-0,009-1,792)	0,400 (-0,290-1,090)
MLG	(%)	Inicio	71,10 (69,50-72,69)	70,84 (69,24-72,44)
		Final	70,21 (68,45-71,96)*	70,44 (68,77-72,11)
		Cambio	-0,891 (-1,792-0,009)	-0,400 (-1,090-0,290)
MM	(%)	Inicio	47,52 (45,92-49,12)	47,63 (46,11-49,16)
		Final	46,44 (45,02-47,86)	46,67 (45,27-48,06)
		Cambio	-1,082 (-2,509-0,345)	-0,970 (-2,211-0,271)
Datos expresados en medias (IC _{95%}). IMC: Índice de Masa Corporal; CCi: Circunferencia de Cintura; MG: Masa Grasa; MLG: Masa Libre de Grasa; MM: Masa Muscular. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento (*p<0,05).				

Tabla 18. Variables antropométricas y de composición corporal de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)	Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)
Peso	(kg)	Inicio	66,28 (62,77-69,79)	61,67 (57,93-65,40)	66,46 (62,99-69,94)	61,18 (57,41-64,95)
		Final	66,06 (62,59-69,54)	61,23 (57,44-65,02)	66,17 (62,66-69,67)	61,35 (57,64-65,05)
		Cambio	-0,213 (-0,469-0,043)	-0,435 (-0,945-0,074)	-0,296 (-0,679-0,088)	0,165 (-0,305-0,635)
IMC	(kg/m ²)	Inicio	24,55 (23,69-25,41)	24,29 (23,12-25,46)	24,62 (23,75-25,49)	23,92 (22,79-25,04)
		Final	24,47 (23,62-25,31)	23,94 (22,75-25,13)*	24,50 (23,64-25,37)	23,98 (22,91-25,05)
		Cambio	-0,084 (-0,183-0,014)	-0,347 (-0,729-0,036)	-0,115 (-0,250-0,020)	0,062 (-0,120-0,243)++
CCi	(cm)	Inicio	81,62 (78,55-84,68)	80,00 (76,50-83,49)	82,57 (79,75-85,38)	79,87 (76,69-83,04)
		Final	81,35 (78,35-84,35)	80,57 (77,13-84,01)	82,09 (79,05-85,14)	80,70 (77,45-83,94)
		Cambio	-0,267 (-1,409-0,876)	0,575 (-0,727-1,877)	-0,473 (-1,290-0,344)	0,830 (-0,380-2,040)
MG	(%)	Inicio	27,66 (25,70-29,62)	30,73 (27,99-33,46)	27,83 (25,80-29,85)	31,13 (28,77-33,49)
		Final	28,61 (26,44-30,78)	31,79 (28,66-34,92)	28,22 (26,15-30,28)	31,57 (28,84-34,29)
		Cambio	0,948 (-0,224-2,120)	1,058 (-0,228-2,344)	0,389 (-0,506-1,285)	0,438 (-0,811-1,686)
MLG	(%)	Inicio	72,34 (70,38-74,30)	69,27 (66,54-72,01)	72,17 (70,15-74,20)	68,87 (66,51-71,23)
		Final	71,39 (69,22-73,56)	68,22 (65,09-71,35)	71,79 (69,72-73,85)	68,43 (65,71-71,16)
		Cambio	-0,948 (-2,120-0,224)	-1,058 (-2,344-0,228)	-0,389 (-1,285-0,506)	-0,438 (-1,686-0,811)
MM	(%)	Inicio	48,03 (46,48-49,57)	46,98 (42,72-51,23)	48,87 (46,85-50,89)	45,44 (43,61-47,27)
		Final	47,45 (45,69-49,20)	44,20 (41,98-46,41)	47,89 (46,13-49,64)	44,43 (42,35-46,51)
		Cambio	-0,582 (-1,706-0,542)	-2,777 (-6,693-1,139)	-0,982 (-2,781-0,818)	-1,004 (-1,994--0,014)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). IMC: Índice de Masa Corporal; CCi: Circunferencia de Cintura; MG: Masa Grasa; MLG: Masa Libre de Grasa; MM: Masa Muscular. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (*p<0,05). Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (++p<0,01).

Tabla 19. Variables antropométricas y de composición corporal de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)	Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)
Peso	(kg)	Inicio	62,12 (58,20-66,03)	66,65 (63,21-70,09)	62,22 (58,31-66,13)	66,59 (63,14-70,03)
		Final	61,72 (57,78-65,66)	66,43 (63,00-69,86)	61,90 (58,07-65,72)	66,44 (62,97-69,90)
		Cambio	-0,395 (-0,895-0,105)	-0,220 (-0,502-0,062)	-0,326 (-0,711-0,059)	-0,153 (-0,559-0,252)
IMC	(kg/m ²)	Inicio	24,22 (23,05-25,39)	25,03 (24,15-25,91)	24,26 (23,05-25,46)	24,93 (24,04-25,81)
		Final	24,06 (22,81-25,31)	24,87 (23,99-25,74)	24,14 (22,93-25,35)	24,86 (23,99-25,73)
		Cambio	-0,158 (-0,361-0,045)	-0,163 (-0,348-0,021)	-0,118 (-0,259-0,024)	-0,066 (-0,211-0,079)
CCi	(cm)	Inicio	78,80 (75,02-82,58)	82,70 (79,74-85,65)	79,84 (76,34-83,33)	83,20 (80,49-85,91)
		Final	79,22 (75,58-82,85)	82,54 (79,60-85,47)	79,33 (75,67-82,99)	83,40 (80,52-86,29)
		Cambio	0,416 (-0,764-1,595)	-0,160 (-1,351-1,031)	-0,505 (-1,811-0,800)	0,203 (-0,632-1,037)
MG	(%)	Inicio	28,99 (25,89-32,10)	29,49 (27,68-31,31)	29,41 (26,42-32,41)	29,60 (27,62-31,57)
		Final	30,64 (27,14-34,14)	29,91 (27,86-31,96)	30,10 (26,94-33,25)	29,86 (27,86-31,86)
		Cambio	1,649 (-0,729-4,026)	0,416 (-0,416-1,248)	0,683 (-0,932-2,298)	0,259 (-0,506-1,024)
MLG	(%)	Inicio	71,01 (67,90-74,11)	70,51 (68,69-72,32)	70,59 (67,60-73,58)	70,40 (68,43-72,38)
		Final	69,36 (65,86-72,86)	70,09 (68,04-72,14)	69,90 (66,75-73,06)	70,15 (68,14-72,15)
		Cambio	-1,649 (-4,026-0,729)	-0,416 (-1,248-0,416)	-0,683 (-2,298-0,932)	-0,259 (-1,024-0,506)
MM	(%)	Inicio	47,41 (43,43-51,40)	47,01 (45,40-48,62)	48,22 (45,43-51,00)	46,53 (45,07-47,98)
		Final	46,29 (43,33-49,25)	46,13 (44,50-47,76)	46,21 (43,60-48,82)	46,58 (44,86-48,30)
		Cambio	-1,126 (-4,384-2,133)	-0,878 (-2,471-0,715)	-2,009 (-5,269-1,251)	0,052 (-0,982-1,085)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). IMC: Índice de Masa Corporal; CCi: Circunferencia de Cintura; MG: Masa Grasa; MLG: Masa Libre de Grasa; MM: Masa Muscular.

Tabla 20. Variables metabólicas de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo	SAX
			(n=67)	(n=67)
Glucosa Basal	(mg/dL)	Inicio	98,03 (95,45-100,6)	98,54 (96,25-100,8)
		Final	98,69 (96,11-101,3)	98,80 (96,74-100,9)
		Cambio	0,662 (-1,322-2,645)	0,262 (-1,398-1,921)
Colesterol Total	(mg/dL)	Inicio	224,6 (217,0-232,2)	223,3 (214,7-231,8)
		Final	220,3 (212,7-227,9)	223,9 (216,4-231,3)
		Cambio	-4,292 (-8,683-0,099)	0,615 (-3,953-5,184)
cLDL	(mg/dL)	Inicio	142,7 (136,5-149,0)	142,6 (135,8-149,4)
		Final	139,8 (133,6-146,0)	142,6 (136,4-148,8)
		Cambio	-2,892 (-6,750-0,965)	-0,015 (-3,984-3,953)
cHDL	(mg/dL)	Inicio	64,49 (61,36-67,63)	63,52 (60,28-66,76)
		Final	62,55 (59,69-65,42)**	62,82 (59,93-65,71)
		Cambio	-1,939 (-3,497--0,380)	-0,708 (-2,114-0,699)
Triglicéridos	(mg/dL)	Inicio	86,83 (78,08-95,58)	85,32 (76,23-94,42)
		Final	89,79 (81,25-98,32)	92,28 (83,01-101,5)
		Cambio	2,954 (-4,067-9,975)	6,954 (-0,013-13,92)
Datos expresados en medias (IC _{95%}). cLDL: Lipoproteína de baja densidad; cHDL: Lipoproteína de alta densidad. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento (**p<0,01).				

Tabla 21. Variables metabólicas de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)	Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)
Glucosa	(mg/dL)	Inicio	97,57 (94,46-100,7)	97,74 (93,43-102,0)	99,05 (96,17-101,9)	97,05 (93,04-101,1)
		Basal				
		Final	98,77 (95,74-101,8)	98,84 (93,55-104,1)	99,21 (96,95-101,5)	97,35 (93,07-101,6)
Colesterol	(mg/dL)	Cambio	1,205 (-0,701-3,110)	1,105 (-3,160-5,371)	0,163 (-1,738-2,064)	0,300 (-2,939-3,539)
		Inicio	222,6 (213,2-231,9)	232,8 (220,8-244,9)	222,9 (212,1-233,6)	227,2 (213,7-240,7)
		Final	220,0 (210,3-229,7)	223,1 (210,7-235,4)	223,9 (213,9-232,9)	226,9 (216,5-237,2)
cLDL	(mg/dL)	Cambio	-2,546 (-7,908-2,817)	-9,790 (-16,48--3,100)	1,000 (-4,290-6,290)	-0,350 (-8,494-7,794)
		Inicio	142,6 (134,7-150,4)	146,6 (137,6-155,6)	144,0 (135,6-152,3)	143,5 (132,3-154,7)
		Final	141,6 (133,7-149,4)	139,0 (129,7-148,3)	143,8 (135,6-152,0)	143,4 (135,0-151,7)
cHDL	(mg/dL)	Cambio	-1,000 (-5,784-3,784)	-7,632 (-13,29--1,975)	-0,209 (-4,853-4,435)	-0,150 (-7,450-7,150)
		Inicio	62,64 (59,11-66,16)	68,53 (62,97-74,09)	61,86 (58,10-65,63)	66,65 (61,59-71,71)
		Final	60,80 (57,44-64,16)	66,20 (62,07-70,33)	61,59 (58,14-65,04)	65,40 (60,68-70,12)
Triglicéridos	(mg/dL)	Cambio	-1,841 (-3,535--0,147)	-2,316 (-5,665-1,033)	-0,279 (-1,829-1,271)	-1,250 (-3,809-1,309)
		Inicio	86,86 (75,25-98,48)	87,42 (76,16-98,68)	84,74 (72,11-97,38)	84,35 (73,18-95,52)
		Final	88,46 (77,64-99,27)	88,90 (77,37-100,4)	92,26 (80,30-104,2)	90,45 (75,73-105,2)
		Cambio	1,591 (-7,205-10,39)	1,474 (-7,781-10,73)	7,512 (-1,160-16,18)	6,100 (-5,551-17,75)
Datos expresados en medias (IC _{95%}). cLDL: Lipoproteína de baja densidad; cHDL: Lipoproteína de alta densidad.						

Tabla 22. Variables metabólicas de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox	Niveles cLDLox	Niveles cLDLox	Niveles cLDLox
			Elevados (n=22)	Normales (n=45)	Elevados (n=22)	Normales (n=45)
Glucosa	(mg/dL)	Inicio	97,74 (93,69-101,8)	98,36 (95,13-101,6)	97,53 (93,19-101,9)	99,18 (96,50-101,9)
		Basal				
		Final	100,4 (95,17-105,7)	98,64 (96,00-101,3)	98,26 (93,72-102,8)	99,07 (96,86-101,3)
		Cambio	2,684 (-0,671-6,040)	0,273 (-2,014-2,559)	0,737 (-1,852-3,325)	-0,114 (-2,180-1,953)
Colesterol	(mg/dL)	Inicio	235,3 (221,5-249,1)	222,1 (213,9-230,2)	230,4 (214,2-246,6)	219,6 (209,9-229,2)
		Total				
		Final	230,3 (214,3-246,3)	217,5 (209,8-225,2)	234,1 (220,6-247,5)	219,6 (210,9-228,3)
		Cambio	-5,053 (-13,23-3,127)	-4,568 (-9,727-0,590)	3,684 (-4,912-12,28)	0,023 (-4,996-5,042)
cLDL	(mg/dL)	Inicio	151,6 (139,5-163,6)	140,6 (134,3-146,8)	148,8 (136,3-161,3)	139,1 (131,3-146,8)
		Final	149,4 (136,8-161,9)	136,8 (130,5-143,0)	150,6 (139,2-162,1)	138,8 (131,7-145,8)
		Cambio	-2,211 (-9,187-4,765)	-3,796 (-8,355-0,764)	1,842 (-6,023-9,707)	-0,296 (-4,688-4,097)
cHDL	(mg/dL)	Inicio	67,37 (61,26-73,48)	63,30 (59,71-66,88)	65,53 (59,38-71,68)	62,68 (58,92-66,44)
		Final	64,00 (58,63-69,37)	62,18 (58,80-65,56)	65,47 (59,40-71,55)	61,86 (58,70-65,02)
		Cambio	-3,368 (-6,922-0,185)	-1,114 (-2,663-0,436)	-0,053 (-2,375-2,270)	-0,818 (-2,447-0,810)
Triglicéridos	(mg/dL)	Inicio	81,58 (72,05-91,10)	90,98 (79,49-102,5)	79,79 (70,13-89,45)	88,93 (76,76-101,1)
		Final	85,00 (73,69-96,31)	92,68 (81,55-103,8)	89,42 (73,90-105,0)	94,84 (83,52-106,2)
		Cambio	3,421 (-7,464-14,31)	1,705 (-7,078-10,49)	9,632 (-1,265-20,53)	5,909 (-2,914-14,73)
Datos expresados en medias (IC95%). cLDL: Lipoproteína de baja densidad; cHDL: Lipoproteína de alta densidad.						

Tabla 23. Variables de seguridad de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo	SAX
			(n=67)	(n=67)
ALT	(UI/L)	Inicio	21,11 (18,84-23,38)	20,03 (18,14-21,92)
		Final	19,49 (17,59-21,39)	20,26 (18,49-22,03)
		Cambio	-1,615 (-3,373-0,143)	0,231 (-1,075-1,537)
AST	(UI/L)	Inicio	24,11 (21,92-26,30)	22,86 (21,50-24,22)
		Final	23,00 (21,53-24,47)	22,94 (21,99-23,89)
		Cambio	-1,108 (-3,039-0,823)	0,077 (-1,004-1,158)
FA	(UI/L)	Inicio	81,28 (74,54-88,02)	80,94 (74,65-87,23)
		Final	79,11 (73,37-84,84)*	79,37 (72,85-85,89)
		Cambio	-2,169 (-4,626-0,287)	-1,569 (-3,478-0,340)
Creatinina	(mg/dL)	Inicio	0,935 (0,904-0,967)	0,946 (0,913-0,980)
		Final	0,920 (0,888-0,952)	0,926 (0,893-0,960)
		Cambio	-0,015 (-0,030--0,001)	-0,020 (-0,040--0,000)
Urato	(mg/dL)	Inicio	4,628 (4,350-4,906)	4,605 (4,341-4,868)
		Final	4,668 (4,402-4,933)	4,623 (4,345-4,902)
		Cambio	0,040 (-0,113-0,193)	0,019 (-0,124-0,161)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). ALT: Alanina Aminotransferasa; AST: Aspartato Aminotransferasa; FA: Fosfatasa Alcalina. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento (*p<0,05).

Tabla 24. Variables de seguridad de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial	Función Endotelial	Disfunción Endotelial	Función Endotelial
			(n=47)	Normal (n=20)	(n=47)	Normal (n=20)
ALT	(UI/L)	Inicio	21,80 (18,85-24,74)	19,95 (16,54-23,36)	20,93 (18,52-23,35)	19,20 (16,42-21,98)
		Final	20,27 (17,68-22,87)	18,16 (16,57-19,75)	20,73 (18,50-22,97)	20,50 (17,90-23,10)
		Cambio	-1,523 (-3,849-0,803)	-1,790 (-4,062-0,483)	-0,140 (-1,530-1,251)	1,300 (-1,476-4,076)
AST	(UI/L)	Inicio	24,84 (21,87-27,82)	22,05 (20,02-24,08)	22,84 (21,28-24,40)	22,40 (19,81-24,99)
		Final	23,25 (21,30-25,20)	22,15 (20,36-23,94)	22,95 (21,84-24,07)	23,20 (21,32-25,08)
		Cambio	-1,591 (-4,247-1,066)	0,158 (-1,388-1,704)	0,116 (-0,930-1,162)	0,800 (-1,216-2,816)
FA	(UI/L)	Inicio	77,77 (70,73-84,82)	83,68 (71,61-95,76)	78,21 (71,42-84,99)	81,15 (70,68-91,62)
		Final	76,27 (69,77-82,78)	82,05 (71,99-92,11)	77,77 (70,83-84,71)	77,30 (66,41-88,19)
		Cambio	-1,500 (-4,237-1,237)	-1,632 (-5,366-2,103)	-0,442 (-2,615-1,731)	-3,850 (-7,191- -0,509)
Creatinina	(mg/dL)	Inicio	0,941 (0,899-0,983)	0,912 (0,873-0,873)	0,964 (0,920-1,007)	0,920 (0,871-0,969)
		Final	0,932 (0,891-0,973)	0,880 (0,837-0,923)	0,944 (0,901-0,987)	0,890 (0,844-0,936)
		Cambio	-0,009 (-0,028-0,010)	-0,032 (-0,052--0,011)	-0,019 (-0,044-0,007)	-0,030 (-0,058--0,002)
Urato	(mg/dL)	Inicio	4,752 (4,389-5,116)	4,337 (3,953-4,721)	4,700 (4,343-5,057)	4,320 (3,975-4,666)
		Final	4,757 (4,419-5,095)	4,368 (3,979-4,758)	4,693 (4,305-5,081)	4,390 (4,062-4,718)
		Cambio	0,005 (-0,171-0,181)	0,032 (-0,243-0,306)	-0,007 (-0,189-0,175)	0,070 (-0,150-0,290)
Datos expresados en medias (IC _{95%}). ALT: Alanina Aminotransferasa; AST: Aspartato Aminotransferasa; FA: Fosfatasa Alcalina.						

Tabla 25. Variables de seguridad de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos del cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)	Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)
ALT	(UI/L)	Inicio	19,79 (15,67-23,91)	21,34 (18,89-23,79)	19,84 (16,89-22,79)	20,48 (18,14-22,82)
		Final	17,79 (16,55-19,03)	20,23 (17,70-22,76)	21,05 (18,31-23,79)	20,30 (18,11-22,48)
		Cambio	-2,000 (-5,793-1,793)	-1,114 (-2,948-0,721)	1,211 (-0,310-2,731)	-0,182 (-1,909-1,545)
AST	(UI/L)	Inicio	22,11 (19,97-24,24)	23,91 (22,23-25,59)	23,32 (21,08-25,55)	22,93 (21,27-24,59)
		Final	22,05 (20,25-23,85)	23,27 (21,45-25,10)	23,58 (21,82-25,34)	22,98 (21,94-24,02)
		Cambio	-0,053 (-1,269-1,163)	-0,636 (-2,650-1,378)	0,263 (-1,293-1,820)	0,046 (-1,342-1,433)
FA	(UI/L)	Inicio	78,74 (68,63-88,84)	82,64 (74,09-91,18)	79,53 (67,94-91,11)	81,98 (74,71-89,24)
		Final	79,53 (69,90-89,15)	78,80 (71,87-85,73)	79,21 (68,30-90,13)	79,84 (72,07-87,62)
		Cambio	0,790 (-2,704-4,283)	-3,841 (-6,859--0,823)	-0,316 (-3,522-2,891)	-2,136 (-4,458-0,185)
Creatinina	(mg/dL)	Inicio	0,911 (0,860-0,961)	0,943 (0,904-0,982)	0,932 (0,879-0,984)	0,955 (0,913-0,996)
		Final	0,895 (0,845-0,944)	0,925 (0,887-0,963)	0,926 (0,878-0,974)	0,932 (0,890-0,974)
		Cambio	-0,016 (-0,038-0,006)	-0,018 (-0,036--0,000)	-0,005 (-0,039-0,029)	-0,023 (-0,046-0,001)
Urato	(mg/dL)	Inicio	4,400 (3,995-4,805)	4,684 (4,337-5,031)	4,326 (3,948-4,705)	4,727 (4,392-5,063)
		Final	4,326 (3,906-4,747)	4,816 (4,492-5,139)	4,311 (3,870-4,751)	4,789 (4,448-5,130)
		Cambio	-0,074 (-0,317-0,170)	0,132 (-0,048-0,312)	-0,016 (-0,214-0,182)	0,061 (-0,119-0,242)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). ALT: Alanina Aminotransferasa; AST: Aspartato Aminotransferasa; FA: Fosfatasa Alcalina.

Tabla 26. Variables de la función vascular de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo (n=67)	SAX (n=67)
PAS	(mmHg)	Inicio	110,3 [104,9 -115,7]	110,9 [106,2-115,5]
		Final	107,4 [101,2-113,7]	101,9 [97,47-106,3]***
		Cambio	-2,792 [-7,536--1,953]	-9,419 [-13,20--5,643]+
PAD	(mmHg)	Inicio	72,86 (70,39-75,33)	74,17 (71,77-76,58)
		Final	71,54 (69,17-73,92)	71,48 (69,01-73,96)***
		Cambio	-1,316 (-3,300-0,668)	-2,688 (-4,690--0,685)
FC	(lpm)	Inicio	69,13 (66,81-71,45)	68,63 (66,07-71,18)
		Final	67,88 (65,81-69,95)	67,67 (65,33-70,00)
		Cambio	-1,250 (-3,501-1,001)	-0,962 (-2,955-1,030)
DMF	(%)	Inicio	8,077 (7,221-8,933)	8,036 (7,042-9,029)
		Final	8,619 (7,596-9,642)	9,462 (8,478-10,45)*
		Cambio	0,542 (-0,347-1,430)	1,427 (0,491-2,362)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; FC: Frecuencia Cardíaca; DMF: Dilatación Mediada por Flujo. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento (*p<0,05, ***p<0,001). Nivel de significación entre los tratamientos (+p<0,05).

Tabla 27. Variables de la función vascular de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)	Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)
PAS	(mmHg)	Inicio	111,6 (103,4-119,9)	108,2 (99,37-117,0)	109,5 (103,8-115,2)	115,0 (106,1-123,9)
		Final	108,8 (100,6-117,0)	105,5 (93,91-117,1)	100,4 (95,31-105,6)**	106,0 (95,78-116,2)**
		Cambio	-2,857 (-9,306-3,592)	-2,700 (-11,24-5,838)	-9,565 (-14,49--4,642)	-9,000 (-14,71--3,295)
PAD	(mmHg)	Inicio	71,98 (68,86-75,09)	71,70 (67,42-75,98)	74,37 (71,44-77,29)	73,00 (68,49-77,51)
		Final	71,16 (68,20-74,11)	70,45 (66,79-74,11)	71,63 (68,42-74,85)	69,65 (65,82-73,48)
		Cambio	-0,822 (-3,205-1,561)	-1,250 (-4,509-2,009)	-2,733 (-5,356--0,111)	-3,350 (-6,314--0,386)
FC	(lpm)	Inicio	68,74 (66,10-71,38)	69,95 (65,39-74,51)	68,01 (64,93-71,10)	68,10 (64,10-72,10)
		Final	68,05 (65,76-70,33)	67,53 (63,26-71,80)	66,40 (63,86-68,95)	69,20 (64,40-74,00)
		Cambio	-0,691 (-3,360-1,975)	-2,425 (-6,535-1,685)	-1,611 (-4,233-1,010)	1,100 (-1,239-3,439)
DMF	(%)	Inicio	6,537 (5,800-7,273)	11,16 (9,818-12,50)	6,570 (5,665-7,475)	10,86 (8,747-12,98)
		Final	7,298 (6,210-8,387)	11,26 (9,512-13,01)	8,930 (7,745-10,12)***	10,70 (8,738-12,65)
		Cambio	0,762 (-0,372-1,895)	0,102 (-1,424-1,627)	2,360 (1,132-3,588)++	-0,166 (-1,381-1,049)
Datos expresados en medias (IC _{95%}). PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; FC: Frecuencia Cardíaca; DMF: Dilatación Mediada por Flujo. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (**p<0,01, ***p<0,001). Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (++p<0,01).						

Tabla 28. Variables de la función vascular de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)	Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)
PAS	(mmHg)	Inicio	109,1 (93,78-124,5)	111,3 (104,6-118,0)	112,2 (103,8-120,7)	110,7 (104,5-117,0)
		Final	105,4 (88,98-121,9)	108,6 (100,4-116,8)	103,2 (94,70-111,8)**	100,7 (94,98-106,4)***
		Cambio	-3,714 (-12,72-5,296)	-2,600 (-9,579-4,379)	-10,56 (-15,54--5,572)	-10,05 (-14,90--5,193)
PAD	(mmHg)	Inicio	73,53 (69,79-77,26)	71,87 (68,57-75,17)	75,37 (70,52-80,22)	73,98 (71,07-76,89)
		Final	70,45 (66,27-74,63)	71,74 (68,77-74,72)	70,82 (66,13-75,50)	71,47 (68,36-74,58)
		Cambio	-3,079 (-5,163--0,995)	-0,122 (-2,674-2,430)	-4,553 (-7,804--1,301)	-2,511 (-5,001--0,022)
FC	(lpm)	Inicio	68,16 (65,33-70,98)	69,69 (66,65-72,73)	65,63 (62,49-68,78)	70,31 (66,97-73,65)
		Final	67,26 (64,10-70,43)	68,37 (65,75-70,98)	66,58 (62,58-70,58)	68,42 (65,50-71,34)
		Cambio	-0,895 (-4,147-2,357)	-1,322 (-4,184-1,539)	0,947 (-1,267-3,162)	-1,889 (-4,580-0,802)
DMF	(%)	Inicio	7,740 (6,189-9,292)	7,974 (7,025-8,922)	9,576 (6,789-12,36)	7,245 (6,412-8,077)
		Final	9,012 (7,076-10,95)	8,432 (7,171-9,694)	10,51 (7,912-13,10)	8,807 (7,929-9,685)*
		Cambio	1,272 (-0,330-2,873)	0,459 (-0,688-1,606)	0,930 (-2,272-4,132)	1,562 (0,775-2,348)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; FC: Frecuencia Cardíaca; DMF: Dilatación Mediada por Flujo. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Tabla 29. Variables del estado oxidativo de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo (n=67)	SAX (n=67)
cLDLox	(ng/mL)	Inicio	98,86 (66,87-130,8)	108,9 (77,37-140,4)
		Final	105,9 (70,96-140,9)	97,44 (67,05-127,8)*
		Cambio	7,052 (-6,832-20,94)	-11,44 (-18,46--4,420)+
8-iso-PGF _{2α}	(ng/mL)	Inicio	54,06 (50,61-57,51)	52,53 (49,55-55,51)
		Final	51,01 (47,58-53,52)	49,47 (46,13-52,22)
		Cambio	-3,050 (-5,011-2,864)	-3,064 (-5,702-1,243)
TBARS	(μMeq.MDA)	Inicio	0,673 (0,446-0,900)	0,696 (0,471-0,921)
		Final	0,613 (0,386-0,763)	0,630 (0,417-0,853)
		Cambio	-0,060 (-0,371-0,173)	-0,066 (-0,348-0,227)
FRAP	(μMeq.T)	Inicio	0,422 (0,404-0,439)	0,421 (0,404-0,437)
		Final	0,433 (0,415-0,450)*	0,425 (0,406-0,445)
		Cambio	0,011 (0,001-0,022)	0,005 (-0,007-0,017)
PON-1	(pg/mL)	Inicio	4,130 (2,733-5,527)	4,187 (3,078-5,296)
		Final	4,514 (2,719-6,310)	3,567 (2,263-4,871)
		Cambio	0,384 (-1,580-2,348)	-0,619 (-2,270-1,031)
NO(x)	(μM)	Inicio	23,57 (20,18-26,96)	25,34 (21,30-29,38)
		Final	22,52 (20,08-24,95)	26,39 (22,18-30,60)
		Cambio	-1,055 (-4,355-2,246)	1,053 (-2,555-4,661)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada; 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano; TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico; FRAP: Capacidad de Reducción Férrica del Plasma; PON-1: Paraoxonasa 1; NO(x): Nitratos+Nitritos. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento (*p<0,05). Nivel de significación entre los tratamientos (+p<0,05).

Tabla 30. Variables del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)	Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)
cLDLox	(ng/mL)	Inicio	98,00 (59,60-136,4)	108,9 (51,60-166,3)	103,8 (66,20-141,4)	123,0 (65,33-180,7)
		Final	105,4 (61,75-149,1)	108,5 (51,26-165,8)	91,94 (56,04-127,8)	111,5 (54,83-168,2)
		Cambio	7,418 (-11,54-26,37)	-0,422 (-5,733-4,889)	-11,84 (-19,51--4,156) ^o	-11,48 (-26,51-3,555)
8-iso-PGF _{2α}	(ng/mL)	Inicio	56,86 (52,25-61,46)	53,60 (45,61-61,58)	59,13 (55,06-63,20)	46,82 (42,59-51,05)
		Final	49,90 (44,06-55,74)	49,27 (44,13-54,41)	56,51 (49,78-63,24)	46,67 (41,35-52,00)
		Cambio	-6,956 (-11,99-1,037)	-4,327 (-12,58-3,923)	-2,616 (-9,785-4,553)	-0,149 (-5,805-5,507)
TBARS	(μMeq.MDA)	Inicio	0,567 (0,332-0,802)	0,827 (0,305-1,349)	0,818 (0,508-1,128)	0,479 (0,219-0,739)
		Final	0,579 (0,334-0,824)	0,598 (0,258-0,939)	0,618 (0,346-0,889)	0,728 (0,294-1,161)
		Cambio	0,012 (-0,326-0,351)	-0,228 (-0,582-0,125)	-0,200 (-0,549-0,148)	0,249 (-0,290-0,788)
FRAP	(μMeq.T)	Inicio	0,429 (0,405-0,452)	0,399 (0,373-0,424)	0,425 (0,403-0,447)	0,401 (0,378-0,424)
		Final	0,440 (0,416-0,464)	0,408 (0,390-0,426)	0,428 (0,403-0,454)	0,407 (0,379-0,436)
		Cambio	0,012 (-0,001-0,024)	0,009 (-0,014-0,032)	0,003 (-0,012-0,019)	0,006 (-0,013-0,025)
PON-1	(ng/mL)	Inicio	5,068 (3,063-7,072)	2,186 (1,318-3,054)	4,218 (3,064-5,372)	2,647 (1,256-4,038)
		Final	4,265 (1,998-6,533)	4,249 (0,990-7,508)	4,030 (2,334-5,726)	2,817 (0,539-5,095)
		Cambio	-0,803 (-3,290-1,684)	2,063 (-0,772-4,899)	-0,188 (-2,119-1,743)	0,170 (-2,207-2,546)
NO(x)	(μM)	Inicio	24,38 (19,73-29,04)	22,90 (18,59-27,20)	26,39 (21,21-31,57)	23,02 (17,38-28,67)
		Final	21,62 (18,63-24,62)	23,43 (19,20-27,66)	25,51 (20,45-30,57)	28,95 (21,44-36,46)
		Cambio	-2,762 (-7,008-1,485)	0,535 (-4,076-5,145)	-0,878 (-4,681-2,925)	5,924 (-1,610-13,46)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada; 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano; TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico; FRAP: Capacidad de Reducción Férrica del Plasma; PON-1: Paraoxonasa 1; NO(x): Nitratos+Nitritos. Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (^op=0,062).

Tabla 31. Variables del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)	Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)
cLDLox	(ng/mL)	Inicio	235,4 (164,3-306,5)	41,22 (31,10-51,33)	258,2 (197,8-318,6)	45,84 (35,39-56,29)
		Final	261,0 (186,3-335,8)°	40,42 (29,94-50,91)	229,5 (164,1-294,9)*	41,70 (31,07-52,33)
		Cambio	25,64 (-15,43-66,71)	-0,794 (-7,923-6,335)	-28,74 (-46,33--11,14)+++	-4,139 (-9,027-0,749)
8-iso-PGF _{2α}	(ng/mL)	Inicio	54,56 (44,28-64,84)	56,21 (52,07-60,36)	56,62 (48,13-65,11)	52,12 (48,61-55,63)
		Final	47,03 (38,34-55,72)	50,92 (47,47-54,36)	46,48 (37,50-55,45)†	52,09 (47,91-56,28)
		Cambio	-7,526 (-21,13-6,078)	-5,295 (-9,223--1,367)	-10,14 (-23,37-3,085)	-0,025 (-3,608-3,559)
TBARS	(μMeq.MDA)	Inicio	0,805 (0,235-1,376)	0,613 (0,379-0,848)	0,453 (0,152-0,755)	0,729 (0,468-0,990)
		Final	0,444 (0,152-0,737)	0,631 (0,396-0,866)	0,726 (0,262-1,190)	0,607 (0,359-0,855)
		Cambio	-0,361 (-0,763-0,042)	0,019 (-0,315-0,352)	0,272 (-0,222-0,769)	-0,123 (-0,432-0,187)
FRAP	(μMeq.T)	Inicio	0,405 (0,378-0,433)	0,427 (0,405-0,450)	0,395 (0,372-0,418)	0,428 (0,406-0,449)
		Final	0,405 (0,378-0,433)	0,442 (0,420-0,464)	0,405 (0,382-0,428)	0,430 (0,404-0,455)
		Cambio	0,005 (-0,012-0,022)	0,015 (0,002-0,027)	0,011 (-0,001-0,023)	0,002 (-0,014-0,018)
PON-1	(ng/mL)	Inicio	4,269 (1,158-7,380)	4,067 (2,502-5,633)	3,566 (2,065-5,066)	4,427 (3,037-5,816)
		Final	2,755 (0,731-4,779)	5,310 (2,854-7,766)	3,012 (0,547-5,476)	3,782 (2,252-5,313)
		Cambio	-1,514 (-4,364-1,335)	1,243 (-1,166-3,653)	-0,554 (-3,214-2,106)	-0,644 (-2,613-1,325)
NO(x)	(μM)	Inicio	17,52 (14,03-21,00)	26,19 (21,77-30,61)	20,88 (14,67-27,08)	27,23 (22,27-32,19)
		Final	18,45 (14,65-22,25)	24,27 (21,34-27,20)	20,95 (14,99-26,92)	28,69 (23,48-33,91)
		Cambio	0,939 (-1,611-3,489)	-1,915 (-6,534-2,704)	0,076 (-4,442-4,595)	1,466 (-3,144-6,075)¥

Datos expresados en medias (IC_{95%}). cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada; 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano; TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico; FRAP: Capacidad de Reducción Férrica del Plasma; PON-1: Paraoxonasa 1; NO(x): Nitratos+Nitritos. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (*p<0,05, °p=0,098, †p=0,080). Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (+++p<0,001, ¥p=0,084).

Tabla 32. Variables del estado inflamatorio de la población en función del tratamiento asignado.

			Placebo	SAX
			(n=67)	(n=67)
PCR-us	(mg/L)	Inicio	1,561 (1,134-1,988)	1,750 (1,257-2,244)
		Final	1,974 (1,439-2,509)◦	1,655 (1,166-2,143)
		Cambio	0,413 (-0,048-0,874)	-0,096 (-0,485-0,293)
Fibrinógeno	(mg/dL)	Inicio	381,3 (368,5-394,1)	381,8 (368,6-395,0)
		Final	388,4 (372,2-404,5)	378,9 (366,8-391,0)
		Cambio	7,094 (-4,915-19,10)	-2,891 (-11,99-6,210)
IL-6	(pg/mL)	Inicio	4,161 (1,707-6,616)	3,201 (1,370-5,032)
		Final	2,145 (0,754-3,537)	1,559 (1,002-2,116)†
		Cambio	-2,016 (-4,527-0,495)	-1,642 (-3,231--0,053)
sVCAM-1	(pg/mL)	Inicio	635.3 (591.1-679.6)	650.8 (603.6-698.1)
		Final	588.7 (554.1-623.3)*	625.0 (584.8-665.1)
		Cambio	-46.66 (-78.69--14.63)	-25.84 (-68.73-17.05)
Datos expresados en medias (IC _{95%}). PCR-us: Proteína C Reactiva ultrasensible; IL-6: Interleucina 6; sVCAM-1: Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 soluble. Nivel de significación entre los valores de inicio y fin en el mismo tratamiento (*p<0,05, ◦p=0,065, †p=0,052,).				

Tabla 33. Variables del estado inflamatorio de la población en función del tratamiento y de la función endotelial.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)	Disfunción Endotelial (n=47)	Función Endotelial Normal (n=20)
PCR-us	(mg/L)	Inicio	1,640 (1,048-2,231)	1,306 (0,938-1,675)	1,909 (1,180-2,638)	1,307 (0,990-1,625)
		Final	2,091 (1,369-2,812)	1,579 (0,962-2,196)	1,830 (1,107-2,553)	1,143 (0,957-1,329)
		Cambio	0,451 (-0,168-1,069)	0,273 (-0,274-0,820)	-0,079 (-0,636-0,478)	-0,164 (-0,405-0,077)
Fibrinógeno	(mg/dL)	Inicio	379,1 (363,2-395,0)	386,9 (365,0-408,8)	379,0 (360,4-397,5)	386,8 (371,3-402,3)
		Final	383,5 (364,5-402,5)	401,6 (369,4-433,9)	373,7 (359,4-388,0)	387,0 (366,1-407,9)
		Cambio	4,409 (-8,490-17,31)	14,72 (-11,99-41,44)	-5,238 (-17,40-6,925)	0,200 (-11,14-11,54)
IL-6	(pg/mL)	Inicio	4,681 (1,660-7,702)	3,325 (-0,858-7,508)	3,814 (1,312-6,316)	1,978 (0,226-3,729)
		Final	2,427 (0,500-4,354)	1,634 (0,349-2,919)	1,784 (1,006-2,562)º	1,062 (0,826-1,299)
		Cambio	-2,254 (-5,338-0,830)	-1,691 (-6,039-2,657)	-2,030 (-4,185-0,125)	-0,916 (-2,488-0,657)
sVCAM-1	(pg/mL)	Inicio	651,0 (599,0-703,0)	595,7 (527,0-664,4)	656,4 (599,9-713,0)	626,3 (537,2-715,3)
		Final	603 ,8 (560,8-646,8)	568,2 (511,5-624,8)	632,8 (593,0-672,5)	595,5 (499,6-691,5)
		Cambio	-47,21 (-89,38--5,037)	-27,53 (-68,87-13,81)	-23,67 (-69,49-22,14)	-30,74 (-126,8-65,35)
Datos expresados en medias (IC95%). PCR-us: Proteína C Reactiva ultrasensible; IL-6: Interleucina 6; sVCAM-1: Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 soluble. Nivel de significación entre los valores de inicio y fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (ºp=0,075).						

Tabla 34. Variables del estado inflamatorio de la población en función del tratamiento y de los niveles séricos de cLDLox.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)	Niveles cLDLox Elevados (n=22)	Niveles cLDLox Normales (n=45)
PCR-us	(mg/L)	Inicio	1,003 (0,860-1,146)	1,798 (1,203-2,393)	1,035 (0,872-1,198)	2,041 (1,355-2,727)
		Final	1,547 (0,935-2,159) ^o	2,179 (1,466-2,892)	1,184 (0,836-1,533)	1,869 (1,192-2,545)
		Cambio	0,544 (-0,033-1,121)	0,381 (-0,232-0,995)	0,150 (-0,218-0,518)	-0,172 (-0,703-0,359)
Fibrinógeno	(mg/dL)	Inicio	379,7 (351,9-407,6)	381,5 (367,5-395,5)	386,1 (353,8-418,3)	378,7 (364,4-392,9)
		Final	389,1 (344,6-433,7)	388,5 (373,3-403,7)	379,9 (352,4-407,5)	377,4 (363,9-391,0)
		Cambio	9,389 (-18,26-37,04)	7,000 (-5,609-19,61)	-6,111 (-24,98-12,76)	-1,230 (-11,81-9,35)
IL-6	(pg/mL)	Inicio	1,725 (0,883-2,567)	5,190 (1,857-8,523)	6,166 (1,309-11,02)	1,921 (0,593-3,249)
		Final	1,746 (0,748-2,744)	2,314 (0,437-4,191)	1,804 (0,778-2,829) [†]	1,454 (0,793-2,114)
		Cambio	0,021 (-0,813-0,854)	-2,876 (-6,303-0,551)	-4,362 (-8,977-0,253)	-0,467 (-1,191-0,257)
sVCAM-1	(pg/mL)	Inicio	645,2 (579,0-711,3)	626,9 (575,7-678,1)	673,4 (614,8-732,0)	639,9 (578,7-701,1)
		Final	586,5 (540,9-632,0)	601,0 (556,2-645,8)	627,1 (539,8-714,4)	621,2 (578,4-664,0)
		Cambio	-58,68 (-107,2--10,21)	-25,89 (-67,05-15,27)	-46,26 (-113,7-21,16)	-18,73 (-71,50-34,03)

Datos expresados en medias (IC_{95%}). PCR-us: Proteína C Reactiva ultrasensible; IL-6: Interleucina 6; sVCAM-1: Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 soluble. Nivel de significación entre los valores de inicio y fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (^op=0,089, [†]p=0,088).

Tabla 35. Variables de la función vascular y del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de los valores de PAS.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			PAS Elevada (n=27)	PAS Normal (n=40)	PAS Elevada (n=27)	PAS Normal (n=40)
PAS	(mmHg)	Inicio	129,8 (126,9-132,8)	101,4 (98,46-104,3)	123,9 (121,3-126,6)	100,7 (97,37-104,0)
		Final	127,2 (116,2-138,10)	99,18 (95,92-102,4)	108,2 (101,3-115,1)***	99,03 (95,59-102,5)
		Cambio	-2,667 (-15,31-9,973)	-2,225 (-5,331-0,881)	-15,75 (-22,01--9,489)+	-1,650 (-4,923-1,623)
PAD	(mmHg)	Inicio	80,33 (77,34-83,33)	66,78 (64,27-69,28)	82,37 (79,65-85,09)	68,64 (66,28-71,00)
		Final	78,57 (75,26-81,89)	66,46 (64,31-68,62)	78,19 (74,62-81,75)*	66,74 (64,17-69,31)
		Cambio	-1,759 (-5,111-1,592)	-0,313 (-2,483-1,858)	-4,185 (-7,713- -0,657)	-1,900 (-4,164-0,364)
DMF	(%)	Inicio	7,173 (6,096-8,249)	8,680 (7,446-9,914)	7,466 (6,009-8,924)	8,425 (7,040-9,810)
		Final	8,072 (6,463-9,681)	8,984 (7,606-10,36)	8,318 (7,011-9,625)	10,25 (8,858-11,63)*
		Cambio	0,899 (-0,191-1,989)	0,304 (-0,960-1,568)	0,852 (-0,379-2,083)	1,820 (0,554-3,085)+
cLDLox	(ng/mL)	Inicio	110,9 (60,57-161,3)	90,05 (49,02-131,1)	114,5 (67,13-161,8)	104,8 (64,61-145,1)
		Final	108,2 (53,70-162,7)	104,3 (58,77-149,7)°	101,6 (53,29-149,9)	94,41 (57,37-131,5)
		Cambio	-2,742 (-15,68-10,19)	14,20 (-7,919-36,32)	-12,85 (-24,48--1,221)	-10,41 (-18,62--2,204)+
8-iso-PGF _{2α}	(ng/mL)	Inicio	53,14 (48,16-58,11)	54,78 (50,02-59,53)	53,33 (48,55-58,11)	52,19 (48,71-55,68)
		Final	48,63 (45,11-52,16)	52,04 (47,55-56,52)	47,83 (43,17-52,49)*	52,83 (48,21-57,45)
		Cambio	-4,503 (-10,02-1,010)	-2,739 (-7,641-2,162)	-5,329 (-9,472--1,187)	0,649 (-4,207-5,505)
NO(x)	(μM)	Inicio	22,01 (18,20-25,82)	24,67 (19,67-29,66)	26,37 (20,25-32,49)	24,59 (19,47-29,71)
		Final	22,90 (19,17-26,63)	22,24 (19,04-25,45)	24,91 (19,78-30,04)	27,48 (21,49-33,47)
		Cambio	0,889 (-3,064-4,842)	-2,420 (-7,182-2,343)	-1,460 (-5,584-2,664)	2,887 (-2,309-8,083)+

Datos expresados en medias (IC_{95%}). PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; DMF: Dilatación Mediada por Flujo; cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada; 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano; NO(x): Nitratos+Nitritos. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (*p<0,05, ***p<0,001, °p=0,056). Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (+p<0,05).

Tabla 36. Variables de la función vascular y del estado oxidativo de la población en función del tratamiento y de los valores de PAD.

			Placebo (n=67)		SAX (n=67)	
			PAD Elevada (n=24)	PAD Normal (n=43)	PAD Elevada (n=24)	PAD Normal (n=43)
PAS	(mmHg)	Inicio	127,4 (121,1-133,8)	103,7 (99,93-107,4)	121,8 (115,8-127,8)	105,9 (100,8-111,0)
		Final	127,2 (116,2-138,1)	100,8 (96,33-105,3)	106,2 (96,50-115,9)**	99,81 (94,83-104,8)**
		Cambio	-2,667 (-15,31-9,973)	-2,833 (-8,463-2,796)	-15,60 (-23,70--7,498)+	-6,476 (-10,37--2,585)
PAD	(mmHg)	Inicio	80,67 (76,98-84,35)	67,54 (65,22-69,85)	84,42 (81,87- 86,96)	68,45 (66,48-70,43)
		Final	78,81 (75,06-82,56)	67,17 (65,05-69,30)	78,04 (73,80-82,28)***	67,62 (65,16-70,07)
		Cambio	-1,854 (-5,021-1,313)	-0,361 (-2,680-1,959)	-6,375 (-10,42--2,330)	-0,837 (-2,691-1,017)
DMF	(%)	Inicio	7,138 (5,703-8,573)	8,512 (7,438-9,587)	8,474 (6,638-10,31)	7,790 (6,574-9,006)
		Final	8,403 (6,276-10,53)	8,719 (7,523-9,915)	9,068 (7,483-10,65)	9,683 (8,385-10,98)**
		Cambio	1,265 (0,117-2,414)	0,207 (-0,923-1,337)	0,594 (-0,679-1,867)	1,893 (0,689-3,098)+
cLDLox	(ng/mL)	Inicio	125,9 (70,41-181,3)	82,65 (46,52-118,8)	129,6 (76,39-182,7)	96,50 (59,73-133,3)
		Final	127,7 (68,22-187,2)	92,84 (52,31-133,4)	121,1 (67,95-174,3)	83,25 (49,04-117,5)
		Cambio	1,830 (-16,78-20,44)	10,19 (-8,256-28,63)	-8,436 (-16,88-0,009)	-13,25 (-22,89--3,602)+
8-iso-PGF _{2α}	(ng/mL)	Inicio	51,67 (45,68-57,67)	55,47 (51,13-59,81)	53,50 (48,16-58,83)	51,97 (51,13-59,81)
		Final	49,35 (45,26-53,45)	51,26 (47,09-55,44)	47,61 (41,98-53,24)°	52,49 (47,84-57,14)
		Cambio	-2,317 (-8,853-4,219)	-4,209 (-8,573-0,155)	-5,886 (-11,52--0,252)	0,518 (-3,549-4,585)
NO(x)	(μM)	Inicio	21,70 (17,79-25,61)	24,65 (19,92-29,37)	26,89 (20,25-33,53)	24,41 (19,55-29,26)
		Final	24,16 (20,68-27,64)	21,57 (18,37-24,77)	24,42 (19,32-29,52)	27,58 (21,82-33,34)
		Cambio	2,464 (-2,100-7,028)	-3,077 (-7,390-1,236)	-2,476 (-6,364-1,411)	3,171 (-1,826-8,168)+

Datos expresados en medias (IC_{95%}). PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; DMF: Dilatación Mediada por Flujo; cLDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada; 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostano; NO(x): Nitratos+Nitritos. Nivel de significación entre los valores de inicio y de fin en el mismo tratamiento y grupo de riesgo (**p<0,01, ***p<0,001, °p=0,058). Nivel de significación entre los tratamientos en el mismo grupo de riesgo (+p<0,05).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) representan, desde hace años, la primera causa de muerte a nivel mundial (WHO 2014; WHO 2011b). En este sentido, la Aterosclerosis es la principal causa de ECV (Lönn et al. 2012) y de mortalidad en todo el mundo (Barquera et al. 2015). Por esta razón, es considerada como una importante epidemia de salud pública internacional (Barquera et al. 2015).

En los últimos años, el conocimiento de la patogenia de la Aterosclerosis ha aumentado, especialmente en lo que se refiere al rol que ejercen sobre ella factores de riesgo cardiovascular (FRCV) emergentes, como la disfunción endotelial (DE) (Gutiérrez et al. 2013; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001; Ribeiro et al. 2009) y los niveles circulantes elevados de la lipoproteína de baja densidad oxidada (cLDLox) (Trpkovic et al. 2015).

Estos FRCV emergentes son claves en todo el proceso aterosclerótico, desde el desarrollo hasta la progresión y las complicaciones de la Aterosclerosis. Asimismo, han demostrado ser predictores de ECV aterosclerótica y de futuros eventos cardiovasculares (CV), incluso entre sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos (Meisinger et al. 2005; Shechter et al. 2009; Shechter et al. 2014; Corrado et al. 2008). Este hecho, unido a que los eventos CV también ocurren en sujetos sin FRCV tradicionales (HTA, diabetes mellitus, dislipemias, obesidad, edad avanzada, etc.) (Trpkovic et al. 2015; Marcovina et al. 2007), hace que surja la necesidad de emplear nuevos marcadores y herramientas que ayuden al reconocimiento, la evaluación y la gestión del riesgo cardiovascular (RCV). Asimismo, hay que destacar cómo el tratamiento de estos FRCV emergentes ha contribuido de forma importante a prevenir la progresión y las complicaciones de la Aterosclerosis. En este sentido, destaca el papel de polifenoles como el hidroxitirosol (HT) y la punicalagina (PC), los cuales han demostrado tener efectos cardioprotectores y antiateroscleróticos al mejorar la función endotelial y proteger frente a la oxidación de las cLDL, entre otros efectos.

El presente estudio es el primer ensayo clínico, hasta donde conocemos, que estudia el efecto de la suplementación oral con HT y PC sobre la prevención primaria de la Aterosclerosis. Esta tesis doctoral se centra, de forma especial, en el efecto que tiene el consumo de estos compuestos minoritarios bioactivos sobre los FRCV emergentes (DE y niveles circulantes elevados de cLDLox), debido a su importante papel como predictores de

ECV aterosclerótica (Gutiérrez et al. 2013; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001; Ribeiro et al. 2009; Trpkovic et al. 2015).

5.1. CARACTERÍSTICAS BASALES GENERALES, DIETÉTICAS, ANTROPOMÉTRICAS Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE LA POBLACIÓN

Las condiciones basales de la población del estudio fueron similares, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las variables analizadas (**Tablas 1-5**).

La muestra final del estudio estuvo constituida por 67 sujetos, de los cuales 14 fueron hombres (20,9%) y 53 mujeres (79,1%), con edades comprendidas entre los 45 y 65 años (edad media: 53 años). A pesar de la existencia de un mayor número de mujeres en el estudio, al realizar la distribución de los grupos teniendo en cuenta el género, se evitó que hubiera diferencias significativas tanto en el porcentaje de mujeres (Placebo/SAX: 78,8% vs. SAX/Placebo: 79,4%) como en el porcentaje de hombres (Placebo/SAX: 21,2% vs. SAX/Placebo: 20,6%) entre ambos grupos (**Tabla 1**). Respecto a la edad de los participantes, tampoco se observaron diferencias significativas entre las secuencias de intervención (**Tabla 1**). Esta ausencia de diferencias en el género y en la edad evitó su posible influencia sobre los resultados obtenidos.

Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el consumo de alcohol (<30 g/día), en el consumo de tabaco o en los hábitos dietéticos de los participantes (**Tablas 1 y 2**). Esta similitud en la dieta habitual de los participantes se pudo observar tanto en el aporte energético, en el porcentaje de consumo de macronutrientes como en la ingesta de alimentos ricos en los compuestos bioactivos empleados en el suplemento (HT y PC) (**Tabla 2**). De esta forma, ambos grupos partieron de un perfil dietético equiparable.

En este sentido y teniendo en cuenta los objetivos nutricionales generales establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *siglas en inglés*) (WHO/FAO 2003) y los objetivos nutricionales específicos para población española establecidos por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (Serra Majem 2011), se observó que la población del estudio presentaba desequilibrios tanto en el perfil calórico como en el perfil lipídico al inicio del ensayo clínico. Este desbalance se caracterizó por la presencia de un mayor aporte energético procedente de las proteínas (17,61 [IC_{95%} 16,14-19,07] %) y

de los lípidos (41,67 [IC_{95%} 38,38-44,96] %), en detrimento del aportado por los hidratos de carbono (37,37 [IC_{95%} 34,15-40,59] %); además de por un consumo superior de AGS (13,03 [IC_{95%} 11,56-14,50] %) y de colesterol (339,7 [IC_{95%} 288,6-390,8] mg/d) al recomendado por los diversos organismos e instituciones (WHO/FAO 2003; Serra Majem 2011). En este aspecto, cabe destacar que no se observaron diferencias significativas ni en el perfil calórico ni en el perfil lipídico entre ambas secuencias de intervención (**Tabla 2**).

Referente a la ingesta de fibra dietética (población total: 22,18 [IC_{95%} 18,14-26,22] g/d; hombres: 22,32 [IC_{95%} 15,92-28,72] g/d; mujeres: 22,17 [IC_{95%} 19,04-25,29] g/d) se observó un consumo inferior a las recomendaciones establecidas (WHO/FAO 2003; Serra Majem 2011). No obteniéndose diferencias significativas entre los grupos en dicha variable (**Tabla 2**).

El consumo de frutas y verduras (3,3 [IC_{95%} 2,7-4,0] raciones/d) también se situó por debajo de los objetivos nutricionales (WHO/FAO 2003; Serra Majem 2011), aunque fue similar entre ambos grupos (**Tabla 2**).

De este modo, la situación nutricional de la población al inicio del estudio estuvo muy alejada de los objetivos nutricionales establecidos (WHO/FAO 2003; Serra Majem 2011). Sin embargo, sigue la tendencia observada en la dieta habitual de la población media española en los últimos años (Moreiras 2015; Ortega RM, Jiménez AI, Perea JM 2014).

Por otro lado y focalizando la atención ahora sobre las características antropométricas y de la composición corporal de la población del estudio, se observó una gran similitud entre los grupos al no obtenerse diferencias significativas entre ellos en ninguna de las variables evaluadas (**Tabla 3**).

El Índice de Masa Corporal (IMC) se considera una de las herramientas adecuadas para clasificar el grado de obesidad de los sujetos (WHO 2000). Este índice es el más utilizado por la mayoría de los estudios epidemiológicos y el recomendado por diversas sociedades científicas y organizaciones de salud internacionales para el diagnóstico clínico de la obesidad (WHO 2000; SEEDO 2000; SEEDO 1996; SEEDO 2007). Esto se debe a su alta reproducibilidad, facilidad de utilización y capacidad de reflejar la adiposidad en gran parte de la población. Si bien, esta técnica no es óptima como indicador de la adiposidad en diversos individuos, entre los que destacan los sujetos musculados o ancianos (SEEDO 2007).

Para definir la obesidad según el IMC, se acepta como punto de corte un IMC ≥ 30 kg/m² o valores superiores al percentil 85 en la distribución de la población de referencia. La Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) en diversos documentos, entre los cuales se encuentra el publicado en el año 2007 (SEEDO 2007), introdujo diversas modificaciones a la clasificación propuesta por la OMS (WHO 2000). En este aspecto, destaca la subdivisión del sobrepeso en 2 categorías, la calificación del sobrepeso de grado II como preobesidad y la introducción de un nuevo grado de obesidad (obesidad grado IV u obesidad extrema) para los sujetos con un IMC ≥ 50 kg/m² (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Criterios SEEDO para definir la obesidad según el índice de masa corporal (IMC) en adultos.

Categoría	Valores límite de IMC (kg/m²)
Peso insuficiente	< 18,5
Peso normal	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥ 50

Consenso SEEDO, 2007.

Teniendo en cuenta la clasificación de la SEEDO, al inicio del presente estudio se obtuvo un IMC medio general de 24,6 [IC_{95%} 23,5-25,7] kg/m², el cual se encuentra dentro de los rangos definidos como normopeso. Sin embargo, un 43,2% de la población presentó sobrepeso (11,9% sobrepeso grado I y 31,3% sobrepeso grado II o preobesidad), habiendo una mayor prevalencia entre los hombres (64,3%) que entre las mujeres (37,7%). En este sentido, hay que destacar que no existieron diferencias significativas entre los grupos ni en el IMC (**Tabla 3**), ni en la distribución de los sujetos con normopeso (Placebo/SAX: 57,6% vs. SAX/Placebo: 55,9%; p=NS) o sobrepeso (Placebo/SAX: 42,4% vs. SAX/Placebo: 44,1%; p=NS).

Por otro lado, los IMC elevados, tanto si hacen referencia al sobrepeso como a la obesidad, son un importante FRCV (WHO 2016b). Además, se encuentran asociados con otros FRCV,

entre los que está la disfunción endotelial (DE) (Campia et al. 2012; Suboc et al. 2013; Benjamin et al. 2004). A este respecto, algunos autores consideran a los IMC por encima del normopeso como predictores de la DE (Thompson et al. 2011). Observándose en el presente estudio cómo los sujetos con sobrepeso tenían un riesgo 2,87 [IC_{95%} 1,26-6,56] veces superior de presentar DE comparado con los sujetos que tenían normopeso.

Respecto a la Circunferencia de Cintura (CCi), es considerada desde hace años como un buen indicador del tejido adiposo abdominal, relacionándose estrechamente con el grado de obesidad central (Pouliot et al. 1994; NCEP/ATP III 2001). De este modo, los valores de riesgo de la CCi están relacionados con un incremento del RCV (Nishida et al. 2010; NCEP-ATP III 2001). Estos valores fueron establecidos en el año 2001 por el Programa Nacional de Estados Unidos de América de Educación sobre el Colesterol (NCEP, *siglas en inglés*) y recogidos en el III Panel de Expertos en Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (ATP III, *siglas en inglés*) (NCEP/ATP III 2001). Posteriormente en el año 2005, la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, *siglas en inglés*) estableció nuevos valores de riesgo para la CCi teniendo en cuenta, no solo las diferencias establecidas por el género como las guías anteriores, sino también el grupo étnico al que pertenece el sujeto (**Cuadro 3**) (Alberti et al. 2006).

Cuadro 3. Valores de obesidad central según la CCi en función del país/etnia específica.

País/grupo étnico	Perímetro de la cintura
Europeos	hombres \geq 94 cm; mujeres \geq 80 cm
Asiáticos del sur	hombres \geq 90 cm; mujeres \geq 80 cm
Chinos	hombres \geq 90 cm; mujeres \geq 80 cm
Japoneses	hombres \geq 85 cm; mujeres \geq 90 cm

Alberti et al., 2006.

En el presente estudio, la media basal poblacional de la CCi fue de 81,6 [IC_{95%} 78,2-84,9] cm, siendo el promedio para los hombres de 90,9 [IC_{95%} 85,1-96,8] cm y para las mujeres de 79,1 [IC_{95%} 77,0-81,2] cm. Teniendo en cuenta la clasificación de la IDF para población europea, la media de la población no mostró obesidad central o abdominal. A pesar de este resultado, hubo un 44,8% de la población que sí presentó obesidad central (43,4% de las mujeres y 50% de los hombres). A este respecto, hay que señalar que no existieron diferencias significativas entre los grupos ni en el CCi (**Tabla 3**), ni en la distribución de los

sujetos que presentaron valores de CCI de riesgo (Placebo/SAX: 45,5 vs. SAX/Placebo: 44,1%; p=NS) o normales (Placebo/SAX: 54,5% vs. SAX/Placebo: 55,9%; p=NS).

Respecto a la composición corporal de la población del estudio, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las variables evaluadas [Masa Libre de Grasa (MLG%), Masa Muscular (MM%) y Masa Grasa (MG%)] (**Tabla 3**). Esta similitud en la composición corporal se observó a pesar de su conocida variabilidad, al depender de múltiples factores tanto intrínsecos como extrínsecos al sujeto (edad, género, dieta, actividad física, etc.) (Carbajal 2013).

La MLG es el componente mayoritario de la composición corporal, puede llegar a constituir aproximadamente un 80% de la misma (Carbajal 2013). Dicha masa suele ser superior en los hombres que en las mujeres y aumenta progresivamente con la edad hasta los 20 años, para posteriormente ir disminuyendo a partir de la edad adulta (Carbajal 2013). Al inicio del presente estudio, la media poblacional de la MLG fue del 71,1 [IC_{95%} 69,4-72,6] %, siendo en las mujeres del 69,6 [IC_{95%} 67,9-71,2] % y en los hombres del 77,0 [IC_{95%} 73,9-80,0] %. No existiendo diferencias significativas entre los grupos en esta variable (**Tabla 3**).

Por otro lado, la MM es el principal componente de la MLG y puede llegar a constituir hasta un 50% de la misma (Carbajal 2013). La MM suele ser superior en los hombres que en las mujeres (Carbajal 2013). En este sentido y en línea con lo descrito, en el presente estudio se obtuvo una media poblacional de la MM del 48,0 [IC_{95%} 46,3-49,6] %, siendo superior en los hombres (52,5 [IC_{95%} 50,2-54,7] %) que en las mujeres (46,8 [IC_{95%} 45,0-48,7] %). A este respecto, hay que señalar que no se observaron diferencias significativas en dicha variable entre los grupos (**Tabla 3**).

Referente a la MG, el porcentaje que supone dentro de la composición corporal puede ser muy variable y al contrario que la MLG, aumenta con la edad y es mayor en las mujeres que en los hombres (Carbajal 2013; SEEDO 2000). En el **Cuadro 4** se puede observar la clasificación ponderal realizada por la SEEDO en función del género y del porcentaje de MG (SEEDO 2000).

Cuadro 4. Clasificación ponderal en función del porcentaje de grasa corporal.

	Hombres	Mujeres
Normopeso	12-20%	20-30%
Límite	21-25%	31-33%
Obesidad	> 25%	> 33%

SEEDO, 2000.

A este respecto, al inicio del presente estudio se obtuvo un porcentaje medio poblacional de la MG del 28,9 [IC_{95%} 27,4-30,6] %, no observándose diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 3**). El promedio entre las mujeres fue del 30,4 [IC_{95%} 28,8-32,1] % y entre los hombres del 23,0 [IC_{95%} 20,0-26,1] %. Estos datos indican que la media de los hombres del estudio se encontraba dentro de los rangos límite para obesidad, mientras que la de las mujeres se hallaba ubicada, aunque por muy poco, dentro de los rangos definidos como normopeso.

5.2. CARACTERÍSTICAS BASALES DEL METABOLISMO GLUCÉMICO Y LIPÍDICO, DE SEGURIDAD, DE LA FUNCIÓN VASCULAR, Y DEL ESTADO OXIDATIVO E INFLAMATORIO DE LA POBLACIÓN

En lo referente al perfil glucémico y lipídico sérico, es bien conocido que la alteración de sus valores normales, tanto en ayunas como en estado postprandial, desempeña un importante papel en la morbilidad CV (Barr et al. 2007; Benn et al. 2012; Castelli et al. 1986; Ballantyne & Hoogeveen 2003; Gould et al. 2007; Langsted et al. 2011; Nordestgaard et al. 2007; J. Liu et al. 2013).

En el presente estudio, ambos grupos partieron de condiciones basales similares tanto en la glucemia basal como en el perfil lipídico, al no observarse diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las variables metabólicas analizadas (**Tabla 4**). Además, las medias poblacionales tanto de la glucemia basal como de las diversas variables del metabolismo lipídico (cLDL, cHDL y triglicéridos), se encontraron dentro de los rangos de normalidad según los valores de referencia establecidos para la población estudiada (ADA 2012; Stone et al. 2014; NCEP/ATP III 2002) (**Tabla 4 y Cuadro 5**). Exceptuando el colesterol total, cuya media estuvo dentro de los rangos considerados como patológicos (≥ 200 mg/dL) (Stone et al. 2014; NCEP/ATP III 2002) (**Tabla 4 y Cuadro 5**).

Cuadro 5. Medias de la glucemia basal y de las diversas variables del metabolismo lipídico de la población del presente estudio vs. valores de referencia para la población estudiada.

	Medias de la población del estudio	Valores de referencia para la población estudiada
Glucosa Basal	97,6 [94,1-101,2] mg/dL	< 126 mg/dL
Colesterol Total	225,7 [213,3-238,0] mg/dL	< 200 mg/dL
cLDL	144,8 [135,0-154,6] mg/dL	< 160 mg/dL
cHDL	66,8 [63,1-70,4] mg/dL en mujeres; 54,6 [49,2-59,9] mg/dL en hombres	≥ 50 mg/dL en mujeres; ≥ 40 mg/dL en hombres
Triglicéridos	83,6 [71,1-96,0] mg/dL	< 150 mg/dL

ADA, 2012; ACC/AHA, 2014; NCEP/ATP III, 2002.

Por otro lado, es importante señalar la existencia de anomalías metabólicas entre la población del estudio. Estas anomalías se pudieron observar a pesar de ser un colectivo aparentemente sano sin tratamiento farmacológico establecido para FRCV como la diabetes de tipo I/II, dislipemias, etc. En este sentido, se observó que un 38,5% de la población presentaba glucemias en ayunas alteradas o prediabéticas (100-125 mg/dL) al inicio del estudio (Expert Committee 1997; Genuth et al. 2003; ADA 2012). Si bien, no hubo ningún sujeto diabético o con una glucemia basal ≥ 126 mg/dL. A este respecto, hay que destacar que no existieron diferencias significativas entre los grupos ni en la glucemia basal (**Tabla 4**), ni en la distribución de los sujetos prediabéticos (Placebo/SAX: 28,1% vs. SAX/Placebo: 48,5%; $p=NS$) o normoglucémicos (Placebo/SAX: 71,9% vs. SAX/Placebo: 51,5%; $p=NS$).

La hipercolesterolemia estuvo presente en un 75,5% de la población al inicio del estudio, aunque sin existir diferencias significativas entre los grupos ni en la colesterolemia (**Tabla 4**), ni en la distribución de los sujetos con hipercolesterolemia (Placebo/SAX: 84,4% vs. SAX/Placebo: 66,7%; $p=NS$) o normocolesterolemia (Placebo/SAX: 15,6% vs. SAX/Placebo: 33,3%; $p=NS$). Cabe señalar que solo el 26,2% de estos sujetos tenía niveles séricos elevados de cLDL, no habiendo diferencias significativas entre los grupos en su distribución (Placebo/SAX: 21,9% vs. SAX/Placebo: 30,3%; $p=NS$). Mientras que la mayoría de los sujetos (90,7% de las mujeres y 92,9% de los hombres) presentaron hipercolesterolemia debido a la existencia de niveles séricos elevados de cHDL, frecuente entre población

española (González-Diego et al. 2009). En la distribución de estos sujetos tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Placebo/SAX: 96,9% vs. SAX/Placebo: 97,0%; $p=NS$) (Stone et al. 2014; NCEP/ATP III 2002).

Por otro lado, la hipertrigliceridemia solo se observó en un 4,6% de la población del estudio, estando dentro de los rangos normales el 95,4% de los sujetos. A este respecto, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni en la trigliceridemia (**Tabla 4**), ni en la distribución de los sujetos con hipertrigliceridemia (Placebo/SAX: 0,0% vs. SAX/Placebo: 9,1%; $p=NS$) o normotrigliceridemia (Placebo/SAX: 100,0% vs. SAX/Placebo: 90,9%; $p=NS$).

Atendiendo ahora a las variables de seguridad analizadas en el estudio (ALT, AST, FA, Creatinina y Urato), se ha podido observar que las medias poblacionales basales se situaron dentro de los rangos de normalidad para la población estudiada (**Cuadro 6**). Además, los grupos partieron de una situación semejante en dichas variables, al no encontrarse diferencias significativas entre los mismos (**Tabla 4**).

Cuadro 6. Medias de las variables de seguridad de la población del estudio vs. valores de normalidad para la población estudiada.

	Medias de la población del estudio	Valores de normalidad para la población estudiada
ALT	20,6 [18,5-22,7] UI/L	< 34 UI/L
AST	23,5 [21,7-25,3] UI/L	< 31 UI/L
FA	81,1 [74,6-87,6] UI/L	30-120 UI/L
Creatinina	0,9 [0,9-1,0] mg/dL	0,7-1,1 mg/dL
Urato	4,6 [4,4-4,9] mg/dL	2,6-6,0 mg/dL

Respecto a la función vascular, las variables que la integraron en el presente estudio fueron: la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), la frecuencia de pulso o frecuencia cardiaca (FC) en reposo y la función endotelial evaluada mediante la dilatación mediada por flujo (DMF) de la arteria braquial.

En lo que respecta a la presión arterial, es bien conocido como cifras por encima de las óptimas, tanto en PAS (>120 mmHg) como en PAD (>80 mmHg), incrementan la

morbimortalidad CV (Guo et al. 2013; Huang et al. 2014; Wang et al. 2013; Huang et al. 2013; Lehmann et al. 2016; Benetos et al. 2002; Lewington et al. 2002; Miura et al. 2001; Sesso et al. 2000). Además, la relación entre la presión arterial y el riesgo de eventos CV es continua, consistente e independiente de otros FRCV (Chobanian et al. 2003). Por lo tanto, la prevención y el tratamiento de la presión arterial elevada son fundamentales para disminuir la carga de la morbimortalidad CV (Lehmann et al. 2016; Guo et al. 2013; Huang et al. 2013; Huang et al. 2014; Ingelsson et al. 2008; Chobanian et al. 2003; Perry et al. 2000).

Al inicio de este ensayo clínico, los valores medios obtenidos para PAS y PAD fueron de 114,4 [IC_{95%} 108,6-120,2] mmHg y de 74,1 [IC_{95%} 70,5-77,6] mmHg, respectivamente (**Tabla 4 y Cuadro 7**). Estos valores se encuentran dentro de los valores definidos como óptimos según los criterios de la Sociedad Europea de Hipertensión, la Sociedad Europea de Cardiología (ESH/ESC, *siglas en inglés*) (Giuseppe Mancia et al. 2013), la Sociedad Española de Hipertensión, la Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH/LELHA) (SEH-LELHA 2005), y el Séptimo y Octavo Informe del Comité Nacional de los Estados Unidos de América sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC 7 y JNC 8, *siglas en inglés*) (James et al. 2014; Chobanian et al. 2003) (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Medias de la presión arterial de la población del estudio vs. valores óptimos según los criterios de ESH/ESC, SEH/LELHA y JNC 7-8.

	Medias de la población del estudio	Valores de referencia para una presión arterial óptima
PAS	114,4 [108,6-120,2] mmHg	< 120 mmHg
PAD	74,1 [70,5-77,6] mmHg	< 80 mmHg

ESH/ESC, 2013; SEH/LELHA, 2005; JNC 7, 2003 y JNC 8, 2014.

A pesar de que los valores medios iniciales de la presión arterial del presente estudio se encontraron dentro de los valores óptimos, se identificó a un 40,3% de la población que presentó preHTA debido a una elevada PAS (120-139 mmHg) y un 34,3% que presentó preHTA debido a una elevada PAD (80-89 mmHg) (Chobanian et al. 2003) (**Cuadro 8**). En consecuencia, estos sujetos presentaban un mayor riesgo aterosclerótico (Im et al. 2014) y de morbimortalidad CV (Lewington et al. 2002; Guo et al. 2013; Huang et al. 2014; Wang et al. 2013; Huang et al. 2013; Lehmann et al. 2016).

Cuadro 8. Clasificación y manejo de la presión arterial en adultos según los criterios del JNC 7.

Clasificación Presión Arterial	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	Modificación Estilos de vida
Normal	< 120	y < 80	Persuadir
Prehipertensión	120-139	o 80-89	SÍ
Etapas 1: Hipertensión	140-159	o 90-99	SÍ
Etapas 2: Hipertensión	≥ 160	o ≥ 100	SÍ

JNC 7, 2003.

En este sentido, hay que señalar que no existieron diferencias significativas entre los grupos ni en la PAS ni PAD (**Tabla 4**), ni en la distribución de los sujetos con preHTA o normotensión (**Cuadro 9**).

Cuadro 9. Distribución de los sujetos con preHTA y normotensión arterial entre los grupos del estudio.

Presión Arterial	Placebo/SAX	SAX/Placebo	P
Normal (PAS: < 120 mmHg)	59,4%	60,0%	NS
Normal (PAD: < 80 mmHg)	59,1%	63,5%	NS
PreHTA (PAS: 120-139 mmHg)	40,6%	40,0%	NS
PreHTA (PAD: 80-89 mmHg)	37,9%	30,6%	NS

La preHTA suele evolucionar con frecuencia a HTA (De Marco et al. 2009; Vasan et al. 2001) aumentando así el RCV (Stamler et al. 1993; Benetos et al. 2001; Benetos et al. 2002; Miura et al. 2001; Sesso et al. 2000). Esta situación se ha podido observar en diversos estudios como el estudio Strong Heart Study o el estudio Framingham (De Marco et al. 2009; Vasan et al. 2001). En el caso del estudio Strong Heart Study, un alto porcentaje de sujetos con preHTA aparentemente sanos (38%) progresó hasta HTA en un periodo de 4 años (De Marco et al. 2009). De hecho, estos autores observaron cómo los valores basales de PAS actuaban como un predictor independiente de la incidencia de HTA, aumentando 1,60 [IC_{95%} 1,30-2,00] veces el riesgo de presentarla cuando incrementaban en 10 mmHg (p<0,001) (De Marco et al. 2009). Asimismo, en el estudio Framingham también se obtuvo un alto

porcentaje de sujetos que evolucionaron de preHTA a HTA en un periodo de 4 años (37,3%) (Vasan et al. 2001).

Por otro lado, al inicio del presente estudio el porcentaje de sujetos con HTA fue bajo (4,5%). Dicha cifra es razonable, ya que uno de los criterios de exclusión del ensayo fue estar bajo tratamiento farmacológico para FRCV tradicionales, entre los que se encuentra la HTA. Hay que señalar que no hubo diferencias significativas en la distribución de los sujetos con HTA entre los diversos grupos (Placebo/SAX: 3,0% vs. SAX/Placebo: 5,9%; $p=NS$).

En lo que respecta a la FC en reposo, sus valores elevados han sido asociados a un incremento del RCV (Rubin et al. 2012). En este sentido, diversos autores consideran a la FC en reposo elevada como un predictor de morbilidad CV (Li 2015; Seccareccia et al. 2001; Fox et al. 2007; Palatini 2007).

En el presente estudio, el valor basal promedio de la FC en reposo fue de 69,2 [IC_{95%} 66,2-72,1] lpm, encontrándose dentro de los valores óptimos (60-100 lpm) establecidos para población adulta (AHA 2016a). A esto hay que añadir, cómo dicha cifra se sitúa por debajo de los valores indicados recientemente por la literatura como de RCV (>80 lpm), al incrementar la mortalidad CV (Rubin et al. 2012; Palatini 2007; Li 2015; Cooney et al. 2010). A este respecto, solo un 9,3% de los participantes de este estudio presentaron una FC en reposo mayor a 80 lpm. No observándose diferencias significativas entre los grupos ni en la FC en reposo (**Tabla 4**), ni en la distribución de los sujetos con FC en reposo elevada (Placebo/SAX: 6,5% vs. SAX/Placebo: 12,1%; $p=NS$) o normal (Placebo/SAX: 93,5% vs. SAX/Placebo: 87,9%; $p=NS$).

Por otro lado, es ampliamente conocida la importancia de la función endotelial en el mantenimiento de la salud vascular (Cahill & Redmond 2016; Gutiérrez et al. 2013; Hirase & Node 2012; Ribeiro et al. 2009; Deanfield et al. 2007; Inoue & Node 2006; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001). Esto es debido, fundamentalmente, a que el endotelio del vaso sanguíneo regula la homeostasis vascular al llevar a cabo acciones que controlan la permeabilidad del vaso sanguíneo, el tono vascular, la adhesión y la trans migración de células inflamatorias, la migración y proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLVs) en la íntima, la supervivencia de diversas células vasculares, la agregación plaquetaria, el balance hemostático/fibrinolítico, y la angiogénesis del vaso sanguíneo (Cahill & Redmond 2016; Deanfield et al. 2007; Kinlay et al. 2001). Por consiguiente, cuando se desarrolla disfunción endotelial (DE) se produce un estado patológico sistémico donde

existe un desequilibrio en la capacidad de homeostasis vascular del endotelio. Esta situación provoca la reducción de la vasodilatación y la promoción de un estado proinflamatorio, prooxidativo y protrombótico a nivel vascular (Cahill & Redmond 2016; Deanfield et al. 2007).

En este sentido, hay que destacar cómo la DE es un estado fisiopatológico clave tanto para la iniciación, como para la progresión y las complicaciones de la Aterosclerosis (Gutiérrez et al. 2013; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001; Ribeiro et al. 2009). Por dicha razón, en los últimos años se ha generado un gran interés por encontrar medidas terapéuticas que logren volver a instaurar la función endotelial vascular normal en aquellos sujetos disfuncionales (Reriani et al. 2011; Li et al. 2013; Gao et al. 2012).

La función endotelial, como se ha mencionado en apartados anteriores, se puede medir mediante diversas técnicas, siendo el método más comúnmente utilizado para su evaluación, principalmente por su sensibilidad y carácter no invasivo, la dilatación mediada por flujo (DMF) arterial. A este respecto, hay que destacar que la DMF ha demostrado tener valor pronóstico de eventos CV futuros, tanto en sujetos sintomáticos con ECV establecida (Xu et al. 2014; Ras et al. 2013) como en sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos (Shechter et al. 2014; Shechter et al. 2009; Corrado et al. 2008).

En el presente estudio, se observó cómo una nada despreciable cifra del 70,2% de los sujetos estudiados presentaban DE al inicio del estudio, mientras que solo el 29,8% tenía una función endotelial normal. Este hecho sucedió a pesar de que la población seleccionada era aparentemente sana y asintomática de ECV. La media poblacional basal de la DMF se situó dentro de los valores definidos como DE (<10%) (Kuvin et al. 2001) con un promedio de 8,06 [IC_{95%} 6,68-9,44] % (**Tabla 4**). En este aspecto, es importante señalar que la población del estudio partió de una situación similar para la función endotelial, al no observarse diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 4**). Tampoco existieron diferencias significativas en la distribución de los sujetos con DE (Placebo/SAX: 63,8% vs. SAX/Placebo: 76,5%; p=NS) o función endotelial normal (Placebo/SAX: 36,2% vs. SAX/Placebo: 23,5%; p=NS) entre ambos.

El Estrés Oxidativo (EO) es otro estado fisiopatológico de gran importancia en el desarrollo y progresión del proceso aterosclerótico (Dinh et al. 2016; Di Minno et al. 2016; Trpkovic et al. 2015; Strobel et al. 2011; Victor et al. 2009; Bonomini et al. 2008; Thomson et al. 2007; Stocker & Keaney 2004). El EO se presenta cuando la producción de las especies reactivas,

principalmente de oxígeno (EROs), no puede ser paliada por la capacidad antioxidante del organismo, produciéndose un desequilibrio a favor de las moléculas prooxidantes en detrimento de las defensas antioxidantes (Montuschi et al. 2007). En este sentido, la presencia de EO puede ocasionar daños celulares por la alteración de diversas biomoléculas (Sies 1991).

Para la evaluación del estado oxidativo en el presente estudio se midieron los niveles séricos de cLDLox, 8-iso-PGF_{2α}, TBARS, FRAP, PON-1 y NO(x). Al inicio del ensayo se observó que la población partió de un estado semejante, al no existir diferencias significativas entre los grupos en dichas variables (**Tabla 5**).

La importancia de la medición de los niveles circulantes de cLDLox reside en que las cLDLox tienen un papel clave en todo el proceso aterogénico, tanto en el desarrollo de la placa aterosclerótica (H. Chen et al. 2008; Holvoet et al. 2007) como en su progresión (Huang et al. 2012; Koenig et al. 2011; Toshima et al. 2000) y desestabilización (Sigala et al. 2010; Uno, Kitazato, et al. 2005; Tsutsui et al. 2002; Nishi et al. 2002; Ehara et al. 2001; Yamashita et al. 2007). Encontrándose los niveles circulantes de cLDLox elevados asociados con todas las etapas de la Aterosclerosis, desde la aterogénesis temprana, HTA, enfermedad arterial coronaria y periférica, hasta los síndromes coronarios agudos e infartos cerebrales isquémicos (Trpkovic et al. 2015).

En consecuencia, diversos estudios han resaltado su utilidad para el diagnóstico y pronóstico de la Aterosclerosis (Trpkovic et al. 2015; Itabe 2003; Huang et al. 2012; Ehara et al. 2001; Tsutsui et al. 2002; Meisinger et al. 2005), observando algunos autores cómo su valoración muestra una mayor sensibilidad y especificidad que FRCV tradicionales para detectar a los sujetos con enfermedad aterosclerótica (Holvoet et al. 2001).

Por todo esto, los niveles de cLDLox circulantes son considerados un predictor de ECV aterosclerótica (Trpkovic et al. 2015; Huang et al. 2012; Holvoet et al. 2001; Suzuki et al. 2002; Faviou et al. 2005; Huang et al. 2008; Wallenfeldt et al. 2004) y de futuros eventos CV (Salonen et al. 1992; Bayés et al. 2006; Bayés et al. 2003; Holvoet et al. 2004; Meisinger et al. 2005; Naruko 2006; Puurunen et al. 1994; Shimada et al. 2004; Shoji et al. 2002; Wallenfeldt et al. 2004), incluso en sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos (Meisinger et al. 2005; Holvoet et al. 2004; Holvoet et al. 2003). En estos últimos es de gran utilidad, al estar asociados los niveles de cLDLox con la fase silenciosa de la progresión de la placa aterosclerótica de forma independiente a los FRCV tradicionales (Wallenfeldt et al. 2004; Hulthe & Fagerberg 2002; Metso et al. 2004).

En el presente estudio el valor basal medio de los niveles circulantes de cLDLox fue de 110,8 [IC_{95%} 64,11-157,5] ng/mL, no observándose diferencias significativas entre los grupos, (**Tabla 5**). De esta manera, la población partió de una situación similar. A esto hay que añadir que los valores obtenidos en este ensayo están en consonancia con los observados en otros estudios, como el realizado por Koubaa y colaboradores, donde se obtuvo un valor promedio de cLDLox circulante de 95,3±37,9 ng/mL en sujetos aparentemente sanos (Koubaa et al. 2007).

Cabe recordar que en el presente estudio se ha utilizado como punto de corte el percentil 75 de la población analizada (P₇₅; cLDLox=131,9 ng/mL), a partir del cual se consideraron como niveles circulantes elevados de cLDLox los valores >P₇₅. Teniendo en cuenta este punto de referencia, se observó al inicio del estudio que el 32,8% de los sujetos tenían niveles circulantes elevados de cLDLox (263,9 [IC_{95%} 196,4-331,3] ng/mL), mientras que el 67,2% presentaban cifras de normalidad (45,8 [IC_{95%} 35,0-56,7] ng/mL). En este aspecto, hay que destacar que no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la distribución de los sujetos con niveles circulantes elevados de cLDLox (Placebo/SAX: 33,3% vs. SAX/Placebo: 32,4%; p=NS) o con cifras de cLDLox ≤P₇₅ (Placebo/SAX: 66,7% vs. SAX/Placebo: 67,6%; p=NS).

Por otro parte, los niveles de isoprostanos también son importantes a la hora de evaluar el estado oxidativo del sujeto. Estas moléculas son eicosanoides formados como productos secundarios de la peroxidación lipídica del ácido araquidónico (Morrow & Fam 2003; Morrow 2006). Dichos productos presentan una gran estabilidad química y pueden ser cuantificados en diversos fluidos biorgánicos (Liu et al. 2009; Milne, Yin, et al. 2007).

Dentro de los isoprostanos destacan las isoformas F₂-isoprostanos, las cuales son importantes marcadores de EO *in vivo* (Milne, Sanchez, et al. 2007; Montuschi et al. 2007; Yin 2008). La isoforma 8-iso-PGF_{2α} (también conocida como 8-epi-PGF_{2α}, 8-isoprostano o 15-isoprostano F_{2T}) merece especial atención debido a su potente efecto vasoconstrictor (Daray et al. 2004) y a que sus cifras elevadas han sido asociadas al grado y severidad de la Aterosclerosis (Basarici et al. 2008; Basarici et al. 2007; Minuz et al. 2006; Vassalle et al. 2003).

Al inicio del presente estudio la media poblacional de 8-iso-PGF_{2α} fue de 58,0 [IC_{95%} 53,8-62,2] ng/mL, no observándose diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 5**). Estos

valores se encuentran en consonancia con lo observado en sujetos aparentemente sanos (Sagun et al. 2015). Como se puede ver en el estudio realizado por Sagun y colaboradores, donde se obtuvo un valor medio de dicha población de 79.84 ± 89.2 ng/mL (Sagun et al. 2015).

Otra variable evaluadora de la peroxidación lipídica y por tanto, del estado oxidativo del sujeto, son los niveles de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, *siglas en inglés*). Esta variable cuantifica los niveles de hidroperóxidos y aldehídos lipídicos existentes en diversos fluidos biorgánicos. En este aspecto, al inicio del presente estudio los niveles séricos medios poblacionales de TBARS fueron de $0,60$ [IC_{95%} $0,33-0,87$] μ Meq.MDA. No observándose diferencias significativas entre los grupos en esta variable (**Tabla 5**).

Por otra parte, para evaluar la capacidad antioxidante del plasma se midió la capacidad de reducción férrica del mismo (FRAP, *siglas en inglés*). Para esta variable, el valor medio basal de la población del estudio estuvo en $0,42$ [IC_{95%} $0,40-0,44$] μ Meq.T. No observándose diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 5**).

Referente a los niveles circulantes de la enzima paraoxonasa 1 (PON-1), enzima que posee un importante papel en la prevención de la oxidación de las cLDL, se observó en el presente estudio una media basal poblacional de $5,08$ [IC_{95%} $3,20-6,96$] ng/mL. En esta variable tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 5**).

Los niveles de nitratos y nitritos circulantes [NO(x)] se midieron para cuantificar la síntesis endógena del óxido nítrico (NO, *siglas en inglés*). Esto es debido a que el NO es una molécula extremadamente inestable que se une al oxígeno para dar lugar principalmente a dos productos: los nitratos (NO_3^-) y los nitritos (NO_2^-). Los NO_3^- y NO_2^- son sus metabolitos estables y se pueden cuantificar en sangre y orina. El vínculo existente entre el NO y la función endotelial es ampliamente conocido, observando diversos estudios una protección frente al daño endotelial producido por una mejora en el funcionamiento de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, *siglas en inglés*), y su consecuente liberación de NO y de sus metabolitos (Vilahur et al. 2015; Storniolo et al. 2014; Zrelli et al. 2013; Heiss et al. 2005).

En el presente estudio, la media poblacional basal de los niveles séricos de NO(x) fue de $25,22$ [IC_{95%} $20,02-30,42$] μ M, sin diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 5**).

Por otra parte, también se tuvo en cuenta en este estudio el estado inflamatorio de los participantes al ser el estado proinflamatorio un evento fisiopatológico importante en el desarrollo y progresión de la Aterosclerosis (Libby et al. 2010; Libby 2012; Tousoulis et al. 2003). En este sentido, las cifras elevadas de diversos biomarcadores inflamatorios (PCR-us, fibrinógeno, IL-6 y sVCAM-1) han sido relacionadas con las ECV (Danesh et al. 2004; Kaptoge et al. 2014) y sus eventos (Savic-Radojevic et al. 2013; Sattar et al. 2009; Danesh et al. 2008; Kaptoge et al. 2014; Danesh et al. 2005; Kaptoge et al. 2007).

Al inicio del presente estudio, el promedio de la población para la proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) y para el fibrinógeno se encontraron dentro de los rangos de normalidad para la población estudiada (**Cuadro 10**). No existiendo entre los grupos diferencias significativas (**Tabla 5**). De este modo, la población partió de una situación similar para dichas variables.

Cuadro 10. Medias de la PCR-us y el fibrinógeno de la población del estudio vs. rangos de normalidad para la población estudiada.

	Medias de la población del estudio	Rangos de normalidad para la población estudiada
PCR-us	1,62 [1,04-2,21] mg/L	0,00-5,00 mg/L
Fibrinógeno	381,2 [362,1-400,3] mg/dL	200-400 mg/dL

La PCR es considerada un miembro prototípico de los reactantes de fase aguda en la especie humana. Sus niveles sanguíneos son el resultado directo de su síntesis hepática. Los niveles séricos elevados de PCR están asociados con un mayor riesgo de morbilidad CV (Parrinello et al. 2015; Danesh et al. 2004; Koenig et al. 1999). El método de PCR ultrasensible (PCR-us) incluye diversas ventajas, entre las que se encuentra la detección de niveles séricos más pequeños y de forma constante. De acuerdo con las pautas indicadas por la Asociación Americana del Corazón (AHA, *siglas en inglés*) en el año 2003 (Pearson et al. 2003) en colaboración con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, *siglas en inglés*), los niveles de PCR-us empleados para determinar el RCV en población adulta se interpretan de la siguiente manera: bajo riesgo (<1 mg/L), moderado riesgo (1-3 mg/L) y alto riesgo (>3 mg/L). Según dichas pautas, las medias basales de los niveles séricos de PCR-us de la población del presente estudio (1,62 [IC_{95%} 1,04-2,21] mg/L) (**Cuadro 10**)

se situaron dentro del rango de RCV moderado (1-3 mg/L). Dichos resultados son similares a los observados en otros estudios realizados sobre población adulta aparentemente sana (Ruiz-Esparza et al. 2013; Oliveira et al. 2009).

Teniendo en cuenta estos valores de referencia, encontramos que un 32,8% de la población del presente estudio presentaba cifras de RCV moderado (1-3 mg/L) y un 7,4% cifras de RCV elevado (>3 mg/L). A este respecto, hay que destacar que la distribución de los sujetos con niveles de PCR-us equivalentes a un RCV moderado (Placebo/SAX: 36,3% vs. SAX/Placebo: 29,4%) o elevado (Placebo/SAX: 0,0% vs. SAX/Placebo: 14,7%), presentó diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,047$).

Respecto a los valores de la interleucina 6 (IL-6) y de la molécula de adhesión celular vascular 1 soluble (sVCAM-1, *siglas en inglés*) observados en este estudio, las medias basales poblacionales fueron de 5,88 [IC_{95%} 1,82-9,95] pg/mL y de 666,4 [IC_{95%} 600,0-732,8] pg/mL, respectivamente. No existiendo diferencias significativas entre los grupos en dichas variables (**Tabla 5**).

En conclusión, la población del presente estudio partió de una situación similar para todas las variables, independientemente de la secuencia a la que fueron aleatoriamente asignados. En este sentido, cabe destacar la homogeneidad de la población gracias a una adecuada selección y aleatorización de la muestra del estudio.

5.3. EVALUACIÓN Y CONTROL DE DIFERENTES EFECTOS Y CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO CRUZADO

El presente estudio es un ensayo clínico cruzado, lo cual significa que cada sujeto recibe dos o más tratamientos en diferentes periodos ordenados secuencialmente. De esta forma, en los ensayos clínicos cruzados cada sujeto ejerce de su propio control (Senn 2003; Piantadosi 2005).

Este tipo de diseño posee múltiples ventajas como la ausencia de la variabilidad interindividual, y una mayor precisión de las observaciones y de la sensibilidad para detectar diferencias entre los diversos tratamientos (Senn 2003; Piantadosi 2005; Cleophas & de Vogel 1998; Ding et al. 2015). Estas ventajas hacen que los estudios cruzados necesiten menores tamaños muestrales para observar diferencias de efecto entre las intervenciones (Senn 2003; Piantadosi 2005; Ding et al. 2015). Desde el punto de vista

ético, también es importante señalar que existe equidad en la administración de los tratamientos debido a que todos los sujetos reciben todos los tratamientos (Senn 2003; Piantadosi 2005; Ding et al. 2015).

Los estudios cruzados son de gran utilidad en patologías crónicas estables. Además, son semejantes a la práctica clínica habitual donde de forma frecuente se prueban diversos tratamientos o intervenciones para una determinada patología en el mismo sujeto (Senn 2003; Piantadosi 2005; Ding et al. 2015).

Los estudios cruzados, sin embargo, adolecen de algunos inconvenientes que hay que tener en cuenta a la hora de realizar el análisis estadístico. Estos inconvenientes son el efecto secuencia, el efecto residual (o de arrastre) y el efecto periodo. El análisis de dichos efectos es importante para evitar el riesgo de sesgo en los resultados y su mala interpretación (Senn 2003).

El efecto secuencia es cuando el orden de las intervenciones afecta al resultado final, es decir, el efecto de cada una de las intervenciones sería diferente según el orden en que se hubiesen llevado a cabo (Senn 2003; Piantadosi 2005; Ding et al. 2015). Este efecto aparece cuando, en alguna variable, la media obtenida entre los diferentes periodos que integran una secuencia es diferente a la observada en la otra secuencia. En este sentido, es importante señalar que no se ha observado efecto secuencia en el presente estudio (**Tablas 6-10**).

El efecto residual o de arrastre se produce cuando los efectos de la intervención del periodo inmediatamente anterior persisten en el periodo siguiente (Senn 2003; Piantadosi 2005; Ding et al. 2015). Este efecto no se ha observado en ninguna de las variables analizadas del presente estudio, excepto en la variable PAS. Para eliminar el efecto residual sobre los resultados obtenidos en esta variable, se siguió la metodología recomendada en las diversas guías consistente en descartar los datos pertenecientes al segundo periodo en dicha variable (Senn 2003; Piantadosi 2005). De esta forma, todos los resultados presentados en este estudio se encuentran exentos de efecto residual. Los análisis estadísticos fueron realizados por la Unidad de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz (HULP).

El efecto periodo hace referencia al cambio en la respuesta atribuible meramente al hecho de que se produzca en un momento determinado de la secuencia experimental. En otras

palabras, si el momento en que se aplica el tratamiento produce diferencias en la respuesta, la estimación del efecto de los tratamientos estará confundida por el efecto periodo (Senn 2003; Piantadosi 2005; Ding et al. 2015). Por esta razón, en el presente estudio se ha controlado esta fuente de confusión en todos los análisis estadísticos al considerarla a la hora de estimar el efecto de los tratamientos. Esto se consigue al introducir como efectos fijos de tipo clase dentro del modelo estadístico al “periodo” y a la “interacción tratamiento x periodo”.

Otros inconvenientes que presentan los ensayos cruzados son el alto porcentaje de abandonos y la baja adherencia a los tratamientos (Senn 2003; Piantadosi 2005; Ding et al. 2015). Sin embargo, la adherencia observada a los tratamientos en el presente estudio fue superior al 90% y el porcentaje de abandono fue muy similar al esperado (20,2% vs. 20%).

5.4. CARACTERÍSTICAS DIETÉTICAS DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV

Desde hace tiempo es conocido el fuerte vínculo que une a la nutrición con el desarrollo y prevención de diversas patologías, entre las que se encuentran las ECV (WHO 2014). A este respecto, se han publicado multitud de estudios que demuestran tanto el efecto protector (Jankovic et al. 2014; Rees et al. 2013; Tresserra-Rimbau et al. 2014; Fitó et al. 2005; Threapleton et al. 2013; Oyebo et al. 2014; Eilat-Adar et al. 2013; Eckel et al. 2014; Taylor et al. 2011) como el efecto dañino (Chiuve et al. 2009; Hunter et al. 2010; Bovalino et al. 2016) de diversos componentes de la dieta frente a las ECV. Incluso asociaciones tan importantes como la Asociación Americana del Corazón (AHA, *siglas en inglés*), han realizado afirmaciones contundentes sobre este tema como la siguiente: *“la dieta y un estilo de vida saludables son las mejores armas para luchar contra la ECV”* (AHA 2016b).

La importancia de la nutrición en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles como las ECV, ha tenido como consecuencia que la OMS y la FAO publicaran un informe de expertos sobre dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas en el año 2003 (WHO/FAO 2003). Este documento de consenso realizado por expertos en la materia, recoge los principales objetivos nutricionales para la población mundial (**Cuadro 11**) (WHO/FAO 2003). Estos objetivos han servido de base para llevar a cabo las actualizaciones de las recomendaciones nutricionales realizadas por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), que actualmente sirven de referencia para la población española (**Cuadro 11**) (Serra Majem 2011).

Cuadro 11. Objetivos nutricionales establecidos por la OMS/FAO (2003) y por la SENC (2011).

	Objetivos nutricionales	
	OMS/FAO (2003)	SENC (2011)
Hidratos de Carbono Totales (%)	55-75%	50-55%
Proteínas Totales (%)	10-15%	10-15%
Lípidos Totales (%)	15-30%	30-35%
AGS (%)	<10%	7-8%
AGM (%)	La diferencia*	20%
AGP (%)	6-10%	5%
Colesterol Total (mg/d)	<300 mg/d	<300 mg/d
Fibra Total (g/d)	>25 g/d	>14 g/1000 kcal (>25 g/d en mujeres y >35 g/d en hombres)
Frutas y verduras (g/d y raciones/d)	≥400 g/d (≥5 raciones/d)	>400 g/d de frutas y >300 g/d de verduras y hortalizas (>5 raciones/d)
* Diferencia obtenida de restar los objetivos nutricionales establecidos para AGS y AGP del computo total que debe suponer en el aporte de los lípidos totales.		

OMS/FAO, 2003 y SENC, 2011.

En algunos alimentos como las frutas, las verduras, frutos secos, etc. existen múltiples compuestos bioactivos minoritarios que podrían contribuir a reducir el RCV (Alissa & Ferns 2017; Roberts & Moreau 2016; Del Bo' et al. 2015; Li et al. 2015; Li et al. 2013; de Figueiredo et al. 2013; Chong et al. 2010; Mulvihill & Huff 2010; Dohadwala & Vita 2009; Basu & Penugonda 2009; Vita 2005; Kris-Etherton et al. 2002; Aviram et al. 2002).

En este aspecto destacan el HT y la PC, los cuales son moléculas bioactivas que se encuentran en alimentos tales como la oliva y la granada, respectivamente, o en productos derivados de los mismos. Por dicho motivo, y debido a que el objetivo principal de este ensayo clínico fue evaluar el efecto del consumo regular de un suplemento con HT y PC sobre diversos marcadores tempranos de la Aterosclerosis, el mantenimiento de los hábitos dietéticos de los sujetos durante el estudio cobró especial importancia tanto en el protocolo como en el seguimiento del mismo. Asimismo, por si dicha condición no se respectara, se controló en el análisis estadístico las posibles fuentes de confusión (cambios dietéticos, enfermedades concomitantes, menor adherencia al tratamiento, etc.) a la hora de estimar el efecto de los tratamientos, evitando así su posible influencia.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el presente estudio, no se han observado cambios significativos en el consumo de energía a lo largo del mismo en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 11, 13 y 15**). En este sentido, se ha observado como de forma habitual existen discrepancias entre la ingesta real y la reportada por los participantes en los registros alimentarios, aun cuando se utilizan métodos de alta fidelidad (Ortega et al. 2015). Por dicha razón, se debe calcular el porcentaje de discrepancia existente entre la ingesta energética (IE) expresada por los participantes y el gasto energético (GE) teórico para personas con peso estable. Para dicho cálculo se empleó la siguiente fórmula: $(GE-IE) \times 100/GE$. La IE estimada fue inferida a partir de la información recogida en las encuestas dietéticas cumplimentadas por el sujeto en el momento de la ingesta. Dichos registros fueron verificados y posteriormente recogidos en el software DIAL (Ortega et al. 2013) por personal cualificado.

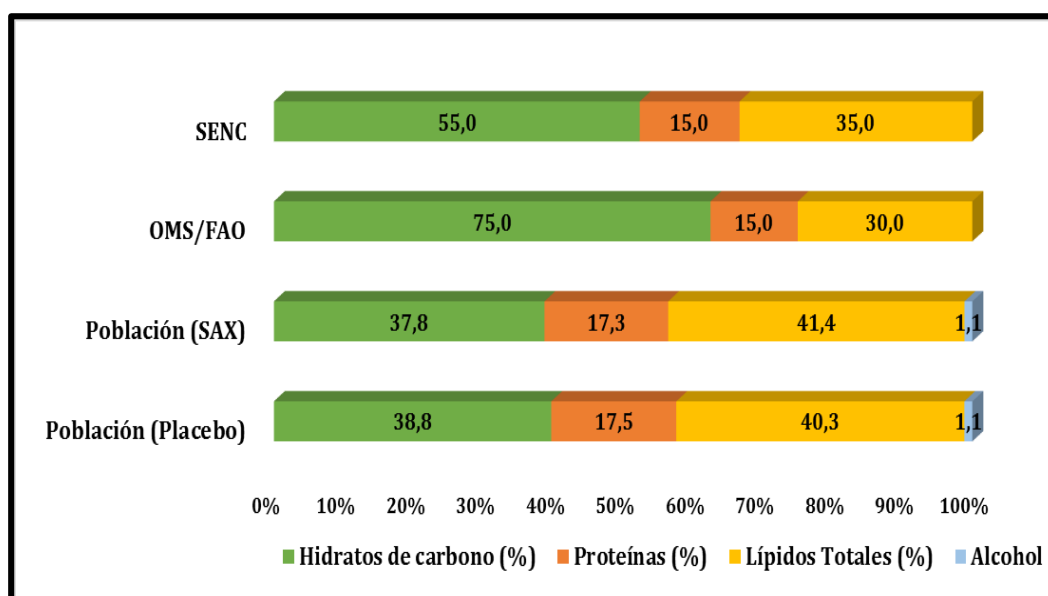
En lo referente a los resultados obtenidos de la formula $(GE-IE) \times 100/GE$, se debe tener en cuenta que los valores positivos hacen referencia a la posible existencia de una infravaloración, mientras que los valores negativos indican una posible sobreestimación de la ingesta reportada (Ortega et al. 1997; Ortega et al. 1995; Ortega et al. 1996). Este método es importante ya que nos ayuda a identificar el porcentaje de sujetos que sobrevaloraron o infravaloraron la IE dentro del estudio.

En el presente estudio existió una sobrevaloración de la IE del $-4,19 \pm 11,4\%$, la cual fue menor al 5% aconsejado, lo que sugiere que la información alimentaria recogida se aproxima bastante a la ingesta real de los participantes (Livingstone & Black 2003). La sobrevaloración obtenida puede ser debida a que el 79,1% de la población del presente estudio fueron mujeres, la cuales se ha observado que suelen reportar ingestas superiores a las que realmente consumen (Moreiras 2015). Este comportamiento concuerda con la tendencia que tienen los sujetos a declarar ingestas más próximas a las consideradas socialmente como correctas (Ortega et al. 2015). Asimismo, es importante señalar que estos resultados siguen el patrón observado en grandes estudios poblacionales realizados sobre población femenina española (Moreiras 2015).

Por otro lado, al mantener los participantes sus hábitos dietéticos durante el estudio, los perfiles calórico y lipídico continuaron desequilibrados a lo largo del mismo (**Tablas 11-16**) según las recomendaciones establecidas (Serra Majem 2011; WHO/FAO 2003). Esta situación de desequilibrio sigue la tendencia observada, desde hace años, en la población española (Moreiras 2015; Ortega RM, Jiménez AI, Perea JM 2014)

El desbalance del perfil calórico estuvo constituido, como se pudo observar en el análisis basal, por un exceso del aporte energético procedente de las proteínas ($17,4 \pm 3,3\%$) y de los lípidos ($40,9 \pm 6,7\%$), en detrimento del aportado por los hidratos de carbono ($38,3 \pm 7,1\%$) (**Gráfica 1**).

Gráfica 1. Perfil calórico de la población del estudio en las diversas intervenciones vs. recomendaciones establecidas por la OMS/FAO (2003) y por la SENC (2011).



Si bien el alcohol forma parte del perfil calórico de la dieta, su estudio merece un apartado especial dentro de la discusión de las variables dietéticas en el presente estudio. Esto es debido a que es la única variable donde se observaron cambios o diferencias significativas en algunos de los grupos evaluados en función del tratamiento y de la presencia o ausencia de FRCV emergentes (**Tablas 13 y 15**). A este respecto, hay que destacar cómo gracias a la adecuada realización del análisis estadístico por parte de la Unidad de Bioestadística del HULP, se evitó cualquier sesgo debido al periodo. Estos cambios se analizarán con más detalle a continuación.

Previamente es importante comentar, de forma liviana, la conocida bidireccionalidad del consumo de alcohol al poder producir tanto efectos protectores como perjudiciales sobre la salud CV (Cahill & Redmond 2012; Guo & Ren 2010; Zhang et al. 2004). La acción del alcohol se lleva a cabo mediante diversos mecanismos moleculares y celulares (Harris et al. 2008; Cahill & Redmond 2012), pudiendo ser debidos sus efectos a la acción directa del

etanol o indirecta de sus metabolitos (Zhang et al. 2004), y/o a la acción de compuestos minoritarios bioactivos presentes en algunas bebidas alcohólicas (Cahill & Redmond 2012).

La controversia existente entre si el consumo de alcohol produce efectos beneficiosos o no sobre el sistema CV, se debe en gran medida a la influencia que ejerce sobre su acción diversos aspectos del sujeto como la genética (Peng & Yin 2009; Zhang et al. 2004), el género (Di Castelnuovo et al. 2006) y la etnia (Peng & Yin 2009; Zhang et al. 2004), además del tipo de bebida alcohólica consumida y la cantidad de alcohol ingerida (Di Castelnuovo et al. 2006). A esto hay que añadir la existencia de una gran variabilidad en el concepto de consumo bajo, moderado y elevado entre los diversos artículos publicados (Kloner & Rezkalla 2007).

A este respecto, la SENC considera el término “consumo moderado” variable según se haga esta recomendación en términos de bebida o de alcohol. Además, hay que tener en cuenta que cuando se hace en relación al concepto de unidad de bebida estándar (UBE), éste es diferente en cada uno de los países que se considere (Serra Majem 2011). Así, en EE.UU. una unidad de bebida alcohólica es definida por aquella ración que contiene 14 g de alcohol y en España, se ha establecido que una UBE corresponde a 10 g de alcohol (100 mL de vino, 200 mL de cerveza o 50 mL de bebida destilada). Por otra parte, las recomendaciones de su consumo deben ser diferentes en función de diversos aspectos del sujeto que pueden modificar la susceptibilidad a los efectos adversos del alcohol (Serra Majem 2011).

Volviendo a retomar los resultados obtenidos en el presente estudio, el consumo de alcohol observado entre la población estuvo dentro de los límites aconsejados por los objetivos nutricionales marcados para la población española (Ortega et al. 2012; Serra Majem 2011). Incluso su ingesta media ($3,18 \pm 5,30$ g/día equivalente al $1,1 \pm 1,6\%$ de la energía de la dieta) fue inferior a la media observada entre la población española (2,1%) (Ruiz et al. 2015). No obstante, este resultado es esperable ya que uno de los criterios de exclusión del estudio fue presentar un consumo de alcohol superior a 30 g/día. Además, el 79,1% de la población estuvo constituida por mujeres, las cuales se ha observado que presentan un consumo inferior de alcohol en comparación con los hombres (Ruiz et al. 2015).

Respecto a las diferencias significativas obtenidas en el porcentaje energético aportado por el alcohol al total de la dieta, es importante señalar que se observaron durante el periodo Placebo en los sujetos con función endotelial normal y en los sujetos con niveles circulantes

elevados de cLDLox (**Tablas 13 y 15**). Existiendo en estos sujetos diferencias significativas entre ambos periodos de intervención en dicha variable (**Tablas 13 y 15**).

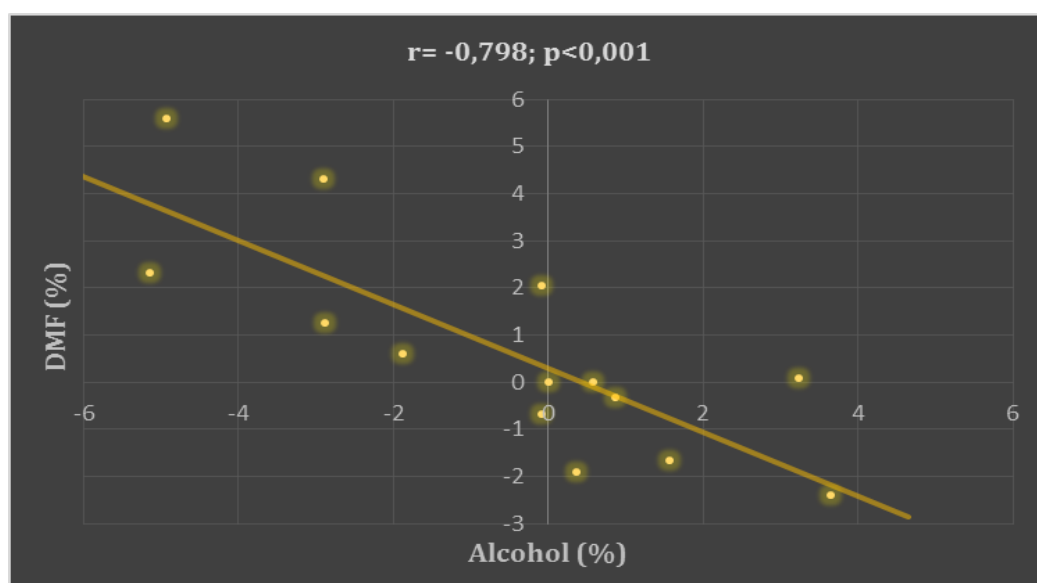
Estos cambios en el consumo de alcohol podrían haber producido sesgos que favorecieran al periodo Placebo en la interpretación de sus resultados en estos sujetos. Sin embargo, al haber sido considerados en el análisis estadístico, se evitó su posible efecto como factores confusores. Este efecto podría haber influido de forma especial en variables como los niveles circulantes de cLDLox y la función endotelial, donde se encontraron diversas correlaciones con el alcohol.

En este sentido, se observó la existencia de una correlación directa entre el aporte de alcohol y los niveles circulantes de cLDLox durante el periodo SAX en los sujetos con niveles circulantes elevados de cLDLox ($r=0,480$; $p=0,002$). Esta relación podría haber causado que al aumentar el aporte de alcohol estos sujetos durante el periodo SAX (**Tabla 15**), aumentarían sus niveles de cLDLox. Quedando así anulado o disminuido el efecto de esta intervención sobre los niveles circulantes de cLDLox. Sin embargo, como se puede observar en la **Tabla 31** no fue así.

Otra de las correlaciones observadas fue la asociación inversa entre el aporte de alcohol y la función endotelial en estos mismos sujetos ($r= -0,618$; $p<0,01$). A este respecto, es importante señalar que el posible efecto deletéreo sobre la función endotelial producido por el aumento del aporte de alcohol de estos sujetos durante el periodo SAX (**Tabla 15**), quedó anulado por el análisis estadístico como se puede observar en la **Tabla 28**.

Lo mismo pudo ocurrir en los sujetos con función endotelial normal que aumentaron su consumo de alcohol durante el periodo SAX (**Tabla 13**). Esto es debido a que en estos sujetos también se observó una asociación inversa entre el aporte de alcohol y la función endotelial durante el periodo SAX ($r= -0,798$; $p<0,001$) (**Gráfica 2**). Sin embargo, este posible efecto confusor quedó controlado (**Tabla 27**).

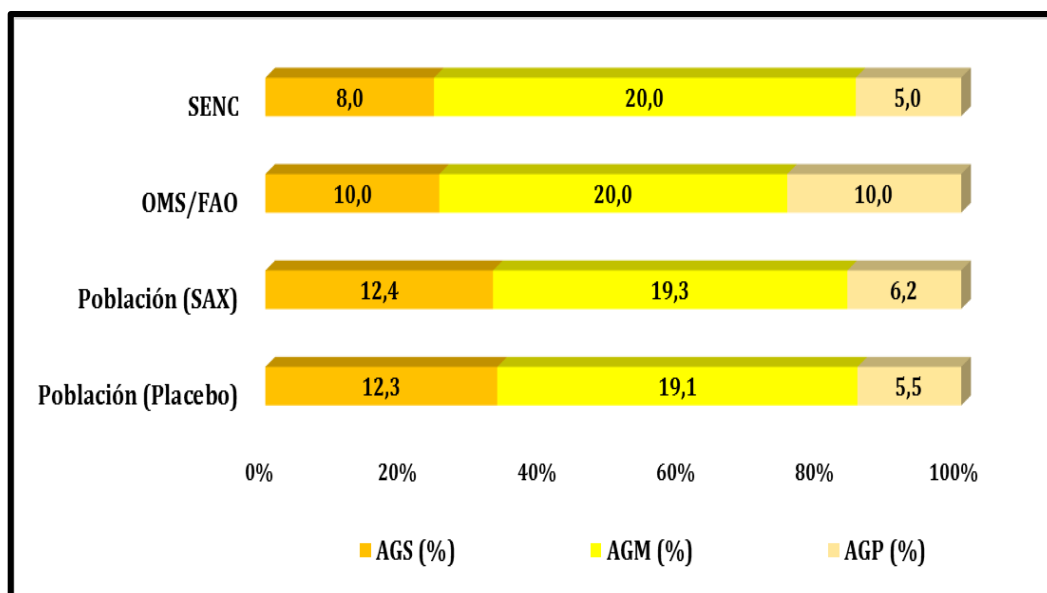
Gráfica 2. Correlación inversamente proporcional entre los cambios observados en el porcentaje energético aportado por el alcohol a la dieta total y la función endotelial en los sujetos con función endotelial normal tras el periodo de intervención SAX.



La relación directa entre los niveles circulantes de cLDLx y el consumo de alcohol también se ha observado en otros estudios (Schroder et al. 2006; Shirpoor et al. 2013). Este es el caso del estudio realizado por Schroder y colaboradores, llevado a cabo en población española ($n=587$; edad media: $49,4 \pm 13,8$ años) con un consumo medio basal de $5,7$ g/d de alcohol y unos niveles medios basales de cLDLx de $65,0$ U/L. En este estudio se obtuvo un incremento de los niveles de cLDLx conforme aumentaba el consumo de alcohol, incluso cuando la bebida alcohólica era rica en polifenoles como es el caso del vino. Además, se observó que un consumo de 10 g/día de alcohol (aprox. 100 mL de una copa de vino) estaba asociado con un incremento significativo de $2,4$ U/L en los niveles de cLDLx. La magnitud y la dirección de la asociación se mantuvo después de ajustar el modelo por diversos factores de estilo de vida y de RCV (Schroder et al. 2006).

Por otra parte en cuanto al perfil lipídico se refiere, no se observaron cambios significativos durante el estudio en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 12, 14 y 16**). En este aspecto, se siguió observando un consumo elevado de AGS ($12,3 \pm 3,2\%$) en comparación con las recomendaciones establecidas, y un consumo de AGM ($19,2 \pm 4,0\%$) y de AGP ($5,9 \pm 1,9\%$) próximo a los objetivos establecidos (WHO/FAO 2003; Serra Majem 2011) (**Gráfica 3**).

Gráfica 3. Perfil lipídico de la población del estudio en función del tratamiento vs. recomendaciones establecidas por la OMS/FAO (2003) y por la SENC (2011).



Este patrón lipídico desequilibrado ha sido observado en diversos estudios realizados en población española, como es el caso del estudio ANIBES donde se observó un consumo medio de AGS del 11,7%, de AGM del 16,8% y de AGP del 6,7% (Ruiz et al. 2015). Esta situación también se puede ver en el estudio realizado por Bondia-Pons y colaboradores, donde se obtuvieron unas medias diarias de AGS del 12,3%, de AGM del 17,9% y de AGP del 7,5% (Bondia-Pons et al. 2007).

Atendiendo ahora al consumo de otros componentes dietéticos como son el colesterol y la fibra dietética total, no se observaron cambios significativos a lo largo del estudio en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 12, 14 y 16**). De esta forma, se continuó observando una ingesta excesiva de colesterol ($326,4 \pm 143,4$ mg/d) y un consumo deficitario de fibra dietética total ($21,5 \pm 8,0$ g/d) en comparación con las recomendaciones establecidas (WHO/FAO 2003; Serra Majem 2011). Estos resultados, sin embargo, siguen la tendencia de las ingestas registradas en la población española (Bondia-Pons et al. 2007; Ruiz et al. 2015; Varela-Moreiras et al. 2013).

Respecto al consumo de frutas y verduras, se ha observado cómo su consumo regular disminuye el RCV (Li et al. 2013; Mulvihill & Huff 2010; Bazzano et al. 2003). En este sentido, diversos estudios han mostrado una relación inversa entre la ingesta de frutas y verduras y la morbilidad CV (Wang et al. 2014; Zhang et al. 2011; Joshipura et al.

2001; Liu et al. 2000; Joshipura et al. 1999). En el presente estudio, no se observaron cambios significativos en el consumo de frutas y verduras en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 12, 14 y 16**). La media poblacional de su ingesta fue de $3,2 \pm 1,6$ raciones/d, lo que la sitúa por debajo de los objetivos nutricionales establecidos (≥ 400 g/día o ≥ 5 raciones de frutas y verduras/día) (WHO/FAO 2003). Aunque en consonancia con lo observado en diversos estudios epidemiológicos sobre el patrón dietético español (Bondia-Pons et al. 2007; Ruiz et al. 2015). Esto se puede observar en el estudio de Bondia-Pons y colaboradores, donde la media de consumo de frutas y verduras fue de 2–3 raciones/d (Bondia-Pons et al. 2007).

En lo que respecta al aceite de oliva, es importante comentar su papel clave en la dieta mediterránea, siendo su principal fuente de grasa vegetal (Covas 2007). El aceite de oliva virgen contiene múltiples compuestos bioactivos, como los polifenoles entre los que destaca el HT (Covas 2007).

La amplia gama de efectos antiaterogénicos asociados al consumo de aceite de oliva puede contribuir a explicar la baja tasa de mortalidad CV que se encuentra en los países mediterráneos del sur de Europa, en comparación con otros países occidentales, a pesar de la alta prevalencia de FRCV (Covas 2007; Covas et al. 2009).

En este sentido, múltiples estudios han observado una asociación entre la ingesta de aceite de oliva y la prevención CV primaria y secundaria (Delgado-Lista et al. 2016; Buckland, Travier, et al. 2012; Bendinelli et al. 2011; Estruch et al. 2013), así como con la disminución de la mortalidad CV y global (Buckland, Mayén, et al. 2012; Buckland, Travier, et al. 2012; Guasch-Ferré et al. 2014; L. Schwingshackl & Hoffmann 2014). De hecho, en el metaanálisis realizado por Schwingshackl y colaboradores concluían que solo el aceite de oliva, como fuente portadora de AGM, disminuía el riesgo de mortalidad CV y global (L. Schwingshackl & Hoffmann 2014).

Cabe destacar que no solo el perfil lipídico del aceite de oliva es el que aporta beneficios a la salud CV. En el estudio Prospectivo Europeo sobre Dieta, Cáncer y Salud (EPIC, *siglas en inglés*) se evaluó el efecto de diferentes tipos de aceites de oliva, observándose un mayor efecto protector del aceite de oliva virgen frente a enfermedades cardíacas que el aportado por la variedad común de aceite de oliva (mezcla de refinado y virgen) (Buckland, Travier, et al. 2012). Si bien es cierto, que ambas variedades disminuyeron la mortalidad global (Buckland, Mayén, et al. 2012).

Esta distinción es importante ya que el aceite de oliva virgen contiene cantidades considerablemente superiores de compuestos bioactivos minoritarios que el aceite de oliva común. En este sentido, es posible que dichos compuestos actúen como los principales responsables de los efectos protectores del aceite de oliva frente a las ECV, entre los cuales destaca el HT (Tejada et al. 2016; Hu et al. 2014; Bulotta et al. 2014; Granados-Principal et al. 2010).

Por estas razones, en el presente estudio el consumo de aceite de oliva virgen fue meticulosamente monitorizado. Cabe recordar que durante todo el estudio los participantes fueron fuertemente aconsejados acerca de mantener su consumo habitual de aceite de oliva, tanto del común como del virgen.

En lo referente a la ingesta de aceite de oliva virgen, se obtuvo una media de consumo de $13,9 \pm 9,1$ g/d, no observándose cambios significativos durante el estudio en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 12, 14 y 16**). Además, se mantuvo la tendencia de consumo observada entre la población española (MAPAMA 2016).

En conclusión, los sujetos mantuvieron sus hábitos dietéticos a lo largo del estudio, excepto algunos grupos estratificados en función del tratamiento y de FRCV emergentes que vieron modificado su consumo de alcohol (**Tablas 13 y 15**). Este posible efecto confusor, que además hubiera favorecido al periodo Placebo, quedó anulado al considerarse dentro del análisis estadístico las posibles fuentes confusoras producidas por el periodo en el momento de estimar el efecto de los tratamientos.

5.5. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV

Como se ha podido observar en apartados anteriores, el sobrepeso y la obesidad juegan un importante papel en el desarrollo de la Aterosclerosis (WHO 2016b; Appiah et al. 2016; WHO 2011b; SEEDO 2007) y en el incremento de la morbimortalidad CV (WHO 2016b; Flint et al. 2010). Métodos como el Índice de Masa Corporal (IMC) son de los más utilizados para clasificar el grado de obesidad de los sujetos (WHO 2000), habiéndose relacionado los IMC por encima del normopeso con un aumento del RCV (Appiah et al. 2016; Van Dis et al. 2009). En este sentido es importante señalar que la asociación entre el IMC y el RCV no es

lineal, sino en forma de “U” (Appiah et al. 2016; Karas et al. 2016) o “J” (Wang et al. 2015), con los matices que esto conlleva. Además, el IMC es una medida de asociación que permite clasificar el estado ponderal de un sujeto, pero no es un indicador óptimo de la adiposidad existente (Gracia-Marco et al. 2016; SEEDO 2007).

En este sentido, el aumento de la adiposidad corporal ha sido íntimamente relacionado con diversos FRCV (Patel & Abate 2013a; Patel & Abate 2013b; Lim & Meigs 2013; P. Liu et al. 2013; Vega et al. 2006; Hayashi et al. 2004; Nguyen-Duy et al. 2003; Boyko et al. 2000; Misra & Vikram 2003) y con un aumento en la morbimortalidad CV (Karastergiou & Fried 2013; Reis et al. 2009; Zhang et al. 2008; Nicklas et al. 2004). Por esta razón, desde hace años se ha prestado especial atención a los métodos que proporcionan información más específica sobre la composición corporal y su relación con el RCV (Karastergiou & Fried 2013; Amato et al. 2013); resultando ser en diversos estudios mejores predictores de ECV (Karas et al. 2016; Sehested et al. 2010; Dalton et al. 2003) y de mortalidad (Dhana et al. 2016; Padwal et al. 2016; Song et al. 2015; Song et al. 2013; Chang et al. 2012; Reis et al. 2009) que el propio IMC.

A este respecto, en el presente estudio no se observaron cambios significativos en las variables antropométricas en función del consumo del Suplemento o de Placebo en la población total (**Tabla 17**). En cambio, en la composición corporal se observaron modificaciones significativas tras el periodo de intervención con Placebo, obteniéndose un incremento en el porcentaje de masa grasa (MG) (de 28,90 [IC_{95%} 27,31-30,50] a 29,79 [IC_{95%} 28,04-31,55] %; $p < 0,05$) y un descenso en el porcentaje de masa libre de grasa (MLG) (de 71,10 [IC_{95%} 69,50-72,69] a 70,21 [IC_{95%} 68,45-71,96] %; $p < 0,05$). Estos cambios en la composición corporal no se observaron tras el periodo con el Suplemento, pudiendo contribuir la ingesta del mismo a mantener una adecuada composición corporal (**Tabla 17**).

En este sentido, diversos estudios han mostrado un efecto antiadipogénico tras la administración de productos derivados del olivo/a o de la granada (Veciana-Galindo et al. 2015; Al-Attar & Shawush 2015; Svobodova et al. 2014; Tabernero et al. 2014; González-Ortiz et al. 2011). Esto se puede observar en el ensayo clínico realizado por González-Ortiz y colaboradores en sujetos con obesidad, donde se obtuvo tras la ingesta de 120 mL/día de zumo de granada durante 4 semanas una disminución del porcentaje de masa grasa, el cual fue significativamente diferente al aumento observado tras Placebo ($-1,4 \pm 3,0\%$ vs. $1,1 \pm 1,1\%$, respectivamente; $p = 0,010$). En este sentido, hay que mencionar que no se

observaron cambios significativos ni en el peso ni en el IMC en el grupo tratado con zumo de granada (González-Ortiz et al. 2011).

Estos efectos antiadipogénicos también se muestran en diversos estudios *in vitro* donde se han utilizado polifenoles de la oliva (Veciana-Galindo et al. 2015; Al-Attar & Shawush 2015; Svobodova et al. 2014; Tabernero et al. 2014). Uno de estos estudios es el realizado por Veciana-Galindo y colaboradores en fibroblastos diferenciados a adipocitos, donde se observó cómo un extracto con polifenoles de la oliva a dosis de 50 mg/L presentaba actividad antiadipogénica al disminuir la acumulación de grasa en las células diferenciadas en un 50%. Mientras que en las células diferenciadas sin tratamiento, la acumulación de grasa fue del 100%. Existiendo diferencias significativas entre ambos periodos de intervención ($p=0,021$). Además, tras el tratamiento con 50 mg/L de extracto con polifenoles de la oliva se observó una disminución de la expresión génica del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR- γ , siglas en inglés) y de la leptina ($p=0,022$) durante la diferenciación a adipocitos (Veciana-Galindo et al. 2015).

Este efecto también se pudo observar en el estudio realizado por Svobodova y colaboradores, donde tras administrar oleuropeína, uno de los principales polifenoles de la oliva, se suprimió la diferenciación adipocitaria *in vitro* por disminución de la expresión génica de PPAR- γ , entre otros efectos (Svobodova et al. 2014).

En el estudio realizado por Al-Attar y colaboradores en ratas con cirrosis, se observó cómo tras la ingesta de los suplementos con extracto de olivo (dosis: 200 mg/kg de peso corporal/día), extracto de romero (dosis: 200 mg/kg de peso corporal/día) y con una mezcla conjunta de ambos extractos (dosis de cada extracto: 100 mg/kg de peso corporal/día) durante 12 semanas, se producía un notable efecto reductor sobre los cambios porcentuales observados en el peso corporal (Al-Attar & Shawush 2015).

En el estudio llevado a cabo por Tabernero y colaboradores en ratas hipercolesterolémicas tratadas con HT o con sus derivados lipofílicos (dosis aprox. de 25 mg/kg de peso corporal/día) durante 8 semanas, se observó tras el tratamiento con los compuestos lipofílicos del HT una mejora en la distribución del tejido adiposo y en la producción de adipoquinas (Tabernero et al. 2014).

Efectos sobre el peso y las adipoquinas también se ha observado en el estudio realizado por McFarlin y colaboradores en ratones con una dieta hiperlipídica tratados con aceite de

semilla de granada (dosis aprox: 61-79 mg/día). En este estudio se observó que tras el tratamiento de 14 semanas con aceite de granada, los ratones disminuyeron su peso corporal ($p=0,002$), la ganancia de peso corporal absoluta ($p=0,002$) y el porcentaje de peso ganado ($p=0,01$) en comparación con aquellos ratones no tratados con aceite de granada. Además, en los ratones no tratados y sometidos a dieta hiperlipídica se observó niveles de leptina 324% veces superiores a los obtenidos en los ratones tratados con aceite de granada. Algo similar ocurrió con los niveles de adiponectina, los cuales fueron 164% veces menores en los ratones no tratados que en los ratones tratados con aceite de granada (McFarlin et al. 2009).

Este efecto antiobesidad de la granada también se observó en el estudio realizado por Ahmed y colaboradores en ratas con obesidad inducida por dieta hiperlipídica. En este estudio se pudo ver cómo, tras la administración de cualquiera de los 3 zumos de granada a las ratas obesas, se producía una disminución de la ganancia del peso. También se observó que el consumo de alimentos, los niveles séricos de leptina y el contenido graso hallado dentro de los hepatocitos disminuía. Asimismo, tras el consumo de los zumos de granada se observaron mejoras en el metabolismo lipídico y glucémico, y en la expresión génica de la adiponectina y de la grelina de dichas ratas (Ahmed et al. 2015).

Por otra parte, si bien en el presente estudio no se han observado cambios significativos en el IMC de la población total en función del tratamiento (**Tabla 17**), sí se observó un descenso en el IMC de los sujetos con función endotelial normal tras el periodo de intervención con Placebo (de 24,29 [IC_{95%} 23,12-25,46] a 23,94 [IC_{95%} 22,75-25,13] kg/m²; $p<0,05$). Este cambio fue significativamente diferente al observado en estos mismos sujetos tras el periodo de intervención con el Suplemento, donde el IMC permaneció estable (Placebo: -0,35 vs. SAX: 0,06 kg/m²; $p<0,01$) (**Tabla 18**). En este sentido, cabe destacar que este descenso en el IMC solo se observó en los sujetos que presentaban normopeso (de 23,17±2,1 a 22,69±1,8 kg/m²; $p<0,05$) y no en los sujetos con sobrepeso. Estos sujetos con sobrepeso incluso incrementaron el IMC tras el periodo intervención con Placebo, aunque no de forma significativa (de 27,63±1,4 a 27,70±1,5 kg/m²; $p=0,817$).

5.6. CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO GLUCÉMICO Y LIPÍDICO DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV

La alteración del perfil glicémico y lipídico, tanto en ayunas como en estado postprandial, desempeña un importante papel inductor en el desarrollo de la Aterosclerosis (WHO

2011b; Jay et al. 2006; Handelsman & Shapiro 2017; ESC/EAS 2016; Gao et al. 2016; Stone et al. 2014; Yang et al. 2014; Isaacs et al. 2013; ESC/EAS 2011; Arsenault et al. 2011; Sampietro et al. 2005; NCEP/ATP III 2002; Wilson et al. 1998) y de la morbimortalidad CV (DeFronzo & Abdul-Ghani 2011; WHO 2011b; Hanna-Moussa et al. 2009; Barr et al. 2007; Benn et al. 2012; Castelli et al. 1986; Ballantyne & Hoogeveen 2003; Gould et al. 2007; Langsted et al. 2011; Nordestgaard et al. 2007). A este sentido, diversos estudios y revisiones sistemáticas han observado efectos protectores de los polifenoles del olivo (Carnevale et al. 2016; Murotomi et al. 2015; Bulotta et al. 2014; Cao et al. 2014; De Bock, Derraik, et al. 2013; Wainstein et al. 2012; Fki et al. 2007; Al-Azzawie & Alhamdani 2006; Komaki et al. 2003) y de la granada (Hosseini et al. 2016; Vilahur et al. 2015; Hamoud et al. 2014; Mirmiran et al. 2010) frente a los trastornos metabólicos.

Este efecto protector ha sido observado tanto en animales de experimentación (Murotomi et al. 2015; Vilahur et al. 2015; Cao et al. 2014; Wainstein et al. 2012; Jemai et al. 2008; Fki et al. 2007; Al-Azzawie & Alhamdani 2006; Komaki et al. 2003; Gorinstein et al. 2002) como en humanos (Hosseini et al. 2016; Carnevale et al. 2016; Hamoud et al. 2014; De Bock, Derraik, et al. 2013; Wainstein et al. 2012; Damasceno et al. 2011; Mirmiran et al. 2010; Violante et al. 2009; Komaki et al. 2003) que padecían de dislipemias y/o hiperglucemias. Excepto en el caso del efecto positivo sobre los niveles de cHDL (Estruch et al. 2006; Covas et al. 2006; Marrugat et al. 2004) y en la mejora del perfil lipídico postprandial (Violi et al. 2015), los cuales también han sido observados en sujetos aparentemente sanos sin trastornos metabólicos tras el consumo de aceite de oliva rico en polifenoles.

En este sentido, en el presente estudio se observó una reducción significativa de los niveles de cHDL tras el periodo de intervención con Placebo en la población total (de 64,49 [IC_{95%} 61,36-67,63] a 62,55 [IC_{95%} 59,69-65,42] mg/dL; $p < 0,01$). No observándose este efecto deletéreo tras el consumo del Suplemento (**Tabla 20**).

En lo referente al resto de las variables del perfil lipídico y glucémico, no se observaron cambios significativos a lo largo del estudio en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 20-22**). De esta manera, los sujetos mantuvieron una glucemia basal y unos niveles de cLDL, de cHDL y de triglicéridos dentro de los rangos de normalidad según los valores de referencia (ADA 2012; Stone et al. 2014; NCEP/ATP III 2002) (**Tablas 20-22**). Excepto en el caso de los sujetos con niveles elevados de cLDL_{ox} que aumentaron la glucemia basal hasta estar dentro de los rangos considerados como prediabéticos (100-125 mg/dL) tras

el periodo de intervención con Placebo. Este efecto negativo, sin embargo, no se observó tras el consumo del Suplemento (**Tabla 22**).

Por otra parte, en los sujetos que presentaron al inicio del estudio trastornos metabólicos como hipercolesterolemia asociada a niveles elevados de cLDL, se observó que tras el consumo del Suplemento hubo una tendencia al descenso tanto en los niveles de colesterol total (de $253,8 \pm 34,0$ a $243,3 \pm 34,5$ mg/dL; $p=0,069$) como en los niveles de cLDL (de $171,1 \pm 21,8$ a $161,1 \pm 27,4$ mg/dL; $p=0,064$). No observándose cambios significativos en los niveles de cHDL ($p=0,495$), en los cuales no presentaban alteraciones. En cambio, en estos mismos sujetos se observó tras el periodo de intervención con Placebo una disminución significativa de los niveles de cHDL (de $64,65 \pm 16,6$ a $61,59 \pm 14,1$ mg/dL; $p=0,048$), no viéndose cambios significativos en los niveles de cLDL ($p=0,350$).

Por otra parte, las mujeres que presentaron niveles bajos de cHDL (<50 mg/dL) mostraron una tendencia al aumento en dichos niveles tras el consumo del Suplemento (de $44,8 \pm 4,2$ a $50,3 \pm 8,2$ mg/dL; $p=0,093$), llegando incluso a cifras de normalidad (≥ 50 mg/dL). Dicho efecto positivo no se observó tras el periodo de intervención con Placebo ($p=0,650$). Respecto a los hombres, no hubo ningún sujeto que presentara valores de cHDL por debajo de los establecidos como normales (<40 mg/dL) (ADA 2012; Stone et al. 2014; NCEP/ATP III 2002).

Por lo tanto, cabe destacar que la tendencia observada en el descenso de los niveles de colesterol total tras el periodo con Placebo ($p=0,098$) fue principalmente debida a la disminución de la fracción cHDL. Mientras que esta misma tendencia observada tras el consumo del Suplemento ($p=0,069$), fue ocasionada por la disminución de la fracción lipídica cLDL.

En lo referente a los sujetos que presentaron hipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dL) al inicio de este estudio, es importante destacar que disminuyeron significativamente sus niveles de triglicéridos tras el consumo del Suplemento (de $200,7 \pm 51,4$ a $155,3 \pm 42,4$ mg/dL; $p=0,017$). No observándose dicho efecto tras el periodo con Placebo ($p=0,700$).

Por otra parte, los sujetos que tenían niveles prediabéticos de la glucemia en ayunas (100 - 125 mg/dL) al inicio del presente estudio, no obtuvieron cambios significativos en la glucemia tras ninguna de las intervenciones (SAX: de $105,6 \pm 8,5$ a $103,4 \pm 10,0$ mg/dL; Placebo: de $107,4 \pm 9,8$ a $106,0 \pm 10,5$ mg/dL).

En este sentido, existen diversos estudios que ponen de manifiesto el efecto protector de los extractos o zumos de granada contra la diabetes tanto en animales de experimentación (Banihani et al. 2013; Huang et al. 2005) como en humanos con dicha patología (Banihani et al. 2014; Banihani et al. 2013). En este aspecto, hay que señalar que en la mayoría de los estudios los efectos protectores no se basan en cambios significativos en la glucemia basal (Sohrab et al. 2017; Sohrab et al. 2015; Sohrab et al. 2014; Fenercioglu et al. 2010; Rosenblat et al. 2006), sino en cambios sobre el estrés oxidativo (EO) presente de forma frecuente en la diabetes o estados de hiperglucemia. A este respecto, el EO disminuye tras la ingesta de extractos o zumos de granada mediante un efecto *scavenger* sobre las especies reactivas (Liu et al. 2014; Rozenberg et al. 2006), una disminución de la glicación avanzada y de sus productos (AGEs, *siglas en inglés*) (Kumagai et al. 2015; Ito et al. 2014; Dorsey & Greenspan 2014) y por un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes (Fuhrman et al. 2010; Mohan et al. 2010; Rock et al. 2008).

Otros cambios observados tras la ingesta de granada que proporcionan efectos protectores frente a la diabetes son un descenso en la resistencia a la insulina (Tsang et al. 2012), un efecto inhibitorio sobre la activación del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB , *siglas en inglés*) (Aggarwal & Shishodia 2004; Schubert et al. 2002) y un efecto activador del factor de transcripción PPAR- γ (Huang et al. 2005). Ambos factores de transcripción involucrados en el metabolismo de la glucosa.

La granada además ejerce efectos protectores frente a la diabetes a través de un efecto inhibitorio sobre la acción de enzimas como las α -glucosidasas (Bellesia et al. 2015; Kawakami et al. 2014) y α -amilasas (Barrett et al. 2013), o reduciendo los niveles de resistina (Makino-Wakagi et al. 2012).

Estos efectos protectores se pueden observar en estudios como el realizado por Sohrab y colaboradores en 60 sujetos diabéticos de tipo II, donde la mitad fueron tratados con 200 mL/día de zumo de granada durante 6 semanas. En este estudio, aun cuando no se observaron cambios significativos en los niveles de la glucemia basal tras el tratamiento con zumo de granada, sí se obtuvieron efectos protectores frente al daño oxidativo a través de la mejora significativa de variables como los niveles de cLDLox, PON-1 y la capacidad antioxidante total (TAC, *siglas en inglés*) (Sohrab et al. 2017).

En el estudio realizado por Rock y colaboradores en 30 sujetos con diabetes de tipo II, se observaron mejoras en factores asociados a la diabetes, pero sin verse modificada significativamente la glucemia. En este estudio se administró a 20 sujetos (10 hombres y 10 mujeres) 50 mL/día de zumo de granada durante 4 semanas y a 10 hombres, 5 mL/día de un extracto de granada durante 6 semanas. No se observaron cambios significativos en la glucemia en ayunas tras ninguno de los tratamientos. Sin embargo, sí se observaron efectos beneficiosos tanto del consumo del zumo como de la ingesta del extracto de granada en la estabilidad y la activación de la enzima PON-1, la cual se encuentra disociada de la cHDL en la diabetes (Rock et al. 2008).

En el estudio de Rosenblat y colaboradores realizado en 20 sujetos, 10 de los cuales eran diabéticos no insulino dependientes, tampoco se observaron mejoras en los niveles de glucemia tras la administración de 50 mL/día de zumo de granada durante 3 meses. Aunque sí se observaron diversas mejoras en el estado oxidativo (Rosenblat et al. 2006).

Por otra parte, los estudios que han analizado el efecto de zumos o de extractos de granada sobre diversos marcadores del metabolismo glucémico en animales (Vilahur et al. 2015; Aviram et al. 2008) o humanos no diabéticos (Tsang et al. 2012), tampoco han observado cambios significativos en la glucemia aunque sí diversos efectos protectores contra dicha patología. Este es el caso del ensayo clínico cruzado de Tsang y colaboradores realizado en 28 sujetos no diabéticos con un IMC entre 25 and 35 kg/m². En este estudio, a pesar de no observarse cambios en la glucemia en ayunas tras el tratamiento con 500 mL/día de zumo de granada durante 4 semanas, sí se obtuvieron mejoras significativas en la insulinemia en ayunas (de 9,36±5,8 a 7,53±4,12 mIU/L; p=0,025) y en la relación cortisol/cortisona en orina (p=0,009) y saliva (p=0,024) (Tsang et al. 2012).

Asimismo, el estudio de Aviram y colaboradores realizado en ratones ateroscleróticos, evaluó el efecto del zumo de granada y de diversos extractos de la granada sobre diversos FRCV de la Aterosclerosis. En este estudio se observó cómo ni el zumo de granada ni la mayoría de los extractos disminuyeron significativamente los niveles de glucemia, excepto el extracto obtenido de la flor del granado que disminuyó significativamente la glucemia comparado con placebo en los ratones ateroscleróticos (p<0,01). A pesar de dicho resultado, la mayoría de los extractos y el zumo de granada redujeron significativamente el tamaño de las lesiones ateroscleróticas existentes en los ratones comparado con placebo (p<0,01), incluso hasta llegar al 70% de reducción en el caso de alguno de los extractos (Aviram et al. 2008).

Diferente a lo que sucede con los extractos de la granada, el tratamiento con extractos de olivo sí ha producido un efecto hipoglucemiante tanto en animales de experimentación con diabetes o estados hiperglucémicos (Umeno et al. 2016; Murotomi et al. 2015; Wainstein et al. 2012; Sedef & Karakaya 2009; Sato et al. 2007; Al-Azzawie & Alhamdani 2006; Komaki et al. 2003) como en humanos prediabéticos o diabéticos (Wainstein et al. 2012; Komaki et al. 2003).

En este sentido, diversos mecanismos han sido propuestos a través de los cuales los extractos de olivo pueden mejorar el metabolismo de la glucosa (Castellano et al. 2016; Umeno et al. 2016; Murotomi et al. 2015; Al-Azzawie & Alhamdani 2006; Komaki et al. 2003). Entre estos mecanismos se encuentra la potenciación de la liberación de insulina inducida por glucosa y el aumento de la captación periférica de la glucosa (Al-Azzawie & Alhamdani 2006; Gonzalez et al. 1992), la inhibición de la acción de diversas enzimas como las α -amilasas (Komaki et al. 2003) y las α -glucosidasas (Castellano et al. 2016), además del efecto protector frente al EO inducido por la diabetes o los estados de hiperglucemia (Castellano et al. 2016; Umeno et al. 2016; Murotomi et al. 2015; Al-Azzawie & Alhamdani 2006).

Esto se puede observar en el estudio realizado por Murotomi y colaboradores en ratones con diabetes de tipo II, a los cuales se administró un suplemento de extracto de olivo (oleuropeína: 35%). En este estudio se obtuvo, tras la suplementación con extractos de olivo, una reducción significativa de la glucemia postprandial ($p < 0,05$) y una mejora en la tolerancia a la glucosa ($p < 0,05$) (a partir de la décima semana). Además de observarse tras la ingesta del suplemento, una reducción en los niveles de EO del 26,2% ($p < 0,05$) evaluado a través de los niveles de ácido hidroxiotadecadienoico total (tHODE, *siglas en inglés*) (Murotomi et al. 2015).

En el estudio llevado a cabo por Al-Azzawie y colaboradores en conejos con diabetes inducida con aloxan, se analizaron 3 grupos: un grupo control con conejos sanos sin diabetes, otro grupo control con conejos diabéticos sin tratamiento y un último grupo con conejos diabéticos tratados con oleuropeína (20 mg/kg de peso corporal). Tras 16 semanas de intervención se observó un descenso significativo en la glucemia basal ($p < 0,05$) en los conejos diabéticos tratados con el extracto de olivo. Este efecto no se observó en el grupo control con conejos diabéticos sin tratamiento, que continuaron exhibiendo elevados niveles de glucosa en sangre durante el estudio. Además, tras la ingesta del suplemento con

oleuropeína, se observó un descenso significativo de los niveles plasmáticos y eritrocitarios de malondialdehído (MDA) ($p < 0,05$) (Al-Azzawie & Alhamdani 2006).

En el estudio de Komaki y colaboradores se utilizó extractos de olivo tanto en ratas diabéticas como en sujetos (con glucemias basales normales: < 110 mg/dL y con glucemias prediabéticas o diabéticas: 110–140 mg/dL). En este estudio se observó una mejora significativa de la glucemia postprandial en las ratas diabéticas tras la administración de los diversos tratamientos con extractos de olivo (20 mg/kg por peso corporal de extracto de olivo o 1 mg/kg por peso corporal de ácido oleanólico o 0,1 mg/kg por peso corporal de luteolina). La evaluación sobre los sujetos se dividió en dos fases: en la primera fase se les administró 300 g de arroz cocido tras aproximadamente 12 horas de ayuno y se midió su glucemia. En la segunda fase, llevada a cabo una semana después de la primera, se les administró 300 g de arroz cocido junto a 1 g de extracto de olivo tras aproximadamente 12 horas de ayuno y se les midió la glucemia. En esta parte del estudio se observó una disminución significativa de la glucemia postprandial en los sujetos con glucemias prediabéticas o diabéticas tras el tratamiento con el extracto de olivo. En cambio, en los sujetos que tenían glucemias normales no se observaron cambios significativos en la glucemia postprandial tras el tratamiento, manteniéndose en los rangos de normalidad. Estos autores sugirieron que dichos efectos en la glucemia postprandial podrían ser debidos a la acción inhibitoria de diversos compuestos del extracto del olivo sobre las α -amilasas pancreáticas y salivares (Komaki et al. 2003).

El estudio de Wainstein y colaboradores fue realizado en ratas diabéticas y en sujetos con diabetes de tipo II ($n=79$). En este estudio se observó en los sujetos diabéticos, tras la administración de 500 mg/día de un extracto de olivo durante 14 semanas, una reducción significativa de la insulinemia en ayunas comparado con placebo ($p=0,01$). Por otra parte, tras el consumo del extracto, se obtuvo una disminución significativa de los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) comparado con placebo ($p=0,037$). Uno de los inconvenientes que presenta este estudio es que para su realización se instruyó a los sujetos para seguir una dieta basada en las recomendaciones de la *American Dietetic Association* (ADA) y un plan de actividad física regular. Sin embargo, no se analizó la posible influencia de estos cambios en el estilo de vida sobre el perfil glucémico. Por otro lado, no se observaron cambios significativos ni en la glucemia ni en el metabolismo lipídico en dichos sujetos. En la parte de experimentación animal de este estudio, se observó una mejora en la digestión y absorción intestinal del almidón administrado (0,6 g de almidón por 100 g de peso corporal) en las ratas diabéticas tratadas con el extracto de olivo (0,1 g

de extracto de olivo por 100 g de peso corporal), aunque no se observaron cambios significativos en los niveles de glucemia (Wainstein et al. 2012).

En otros estudios donde se evaluó el efecto de extractos del olivo sobre sujetos con diversas patologías, pero sin diabetes, no se observaron mejoras sobre la glucemia basal (Pais et al. 2016; De Bock, Derraik, et al. 2013). Sin embargo, en algunos estudios sí se observaron mejoras sobre la glucemia postprandial (De Bock, Derraik, et al. 2013). Este es el caso del ensayo clínico cruzado realizado por De Bock y colaboradores en 46 hombres con sobrepeso de mediana edad, donde se evaluaron los efectos de un suplemento con HT (9,7 mg/día de HT y 51,1 mg/día de oleuropeína) sobre el metabolismo glucémico y lipídico. En este estudio, tras 12 semanas de intervención consumiendo el suplemento, no se observaron cambios significativos sobre el metabolismo lipídico y no se realizaron alegaciones sobre los efectos obtenidos en la glucemia en ayunas. En cambio, estos investigadores sí observaron reducciones en la glucemia ($p=0,008$) e insulinemia ($p=0,041$) postprandial tras el consumo del suplemento. Además, comparándolo con el periodo de intervención con placebo, se observaron mejoras en la sensibilidad a la insulina ($p=0,024$) y en la capacidad de respuesta de la células β pancreáticas ($p=0,013$) (De Bock, Derraik, et al. 2013).

Por otra parte, diversos estudios donde se ha evaluado el efecto de extractos de granada sobre el metabolismo lipídico, han observado cambios en aquellos sujetos que presentaban dislipemias (Hosseini et al. 2016; Hamoud et al. 2014; Mirmiran et al. 2010). Algunos de los mecanismos por los cuales la granada pueda ejercer un efecto protector frente a los trastornos del metabolismo lipídico son la disminución de la biosíntesis del colesterol, al afectar a rutas por debajo del mevalonato y de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) (Fuhrman et al. 2005), y la disminución de la biosíntesis de triglicéridos a través del descenso de la actividad de la enzima diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1, *siglas en inglés*) (Rosenblat & Aviram 2011). Además, los extractos de granada pueden disminuir el contenido lipídico sérico en general. Esto es debido a que activan el factor de transcripción receptor de peroxisoma-proliferador-activado alfa (PPAR- α , *siglas en inglés*), importante en el metabolismo lipídico (Al-Muammar & Khan 2012). A la par que disminuyen la actividad de la lipasa hepática (LH) (Al-Muammar & Khan 2012) y de la lipasa pancreática (Lei et al. 2007) (Lei et al. 2007), y descenden la ingesta energética y aumentan la excreción fecal de lípidos (Al-Muammar & Khan 2012). Este efecto protector frente a los trastornos del metabolismo lipídico también

es mediado al proteger frente al EO frecuente en dislipemias (Hosseini et al. 2016; Hamoud et al. 2014).

El efecto de la granada frente a las dislipemias se puede observar en el estudio piloto realizado por Hamoud y colaboradores en 23 sujetos con hipercolesterolemia. En este estudio se obtuvo, tras administrar simvastatina (20 mg/día) con placebo o con 1 g/día de suplemento de extracto de granada durante dos meses, un descenso significativo de los niveles séricos de cLDL (-23,0% vs. -26%, respectivamente; $p < 0,001$). Si bien, no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p = 0,14$). Por otra parte, ninguna de las terapias utilizadas en este estudio aumentó significativamente los niveles de cHDL ($p = 0,43$) (Hamoud et al. 2014).

En el estudio de Hosseini y colaboradores en 42 sujetos con dislipemias y sobrepeso u obesidad, se observó tras administrar 1000 mg/día de extracto de granada durante 1 mes un descenso significativo en los niveles de colesterol total ($p < 0,01$), cLDL ($p < 0,01$) y triglicéridos ($p < 0,001$). Además de un incremento significativo en los niveles de cHDL ($p < 0,001$) (Hosseini et al. 2016).

Este efecto hipolipemiante también se pudo observar en el estudio llevado a cabo por Mirmiran y colaboradores en 51 sujetos con dislipemia. En este ensayo clínico se obtuvo, tras la administración de 800 mg/día de aceite de semilla de granada durante 4 semanas, una reducción significativa de los niveles de triglicéridos (de $3,45 \pm 1,56$ a $2,75 \pm 1,40$ mmol/L; $p = 0,009$) y en la relación triglicéridos/cHDL (de $7,49 \pm 4,95$ a $5,73 \pm 4,55$; $p = 0,031$). Asimismo, se observaron diferencias significativas en la relación colesterol total/cHDL entre el grupo tratado con aceite de granada y el grupo control (-0,42 vs. 0,01, respectivamente; $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron cambios ni diferencias significativas en los niveles de colesterol total, cLDL, relación cLDL/cHDL tras el tratamiento con aceite de granada (Mirmiran et al. 2010).

Por otro lado, en diversos estudios donde se ha evaluado el efecto protector de los polifenoles del olivo sobre el metabolismo lipídico, se han observado cambios significativos en el perfil lipídico tanto en animales de experimentación con dislipemias (Cao et al. 2014; Jemai et al. 2008; Fki et al. 2007; Gorinstein et al. 2002) como en humanos con dichas alteraciones metabólicas (Carnevale et al. 2016; Damasceno et al. 2011; Susalit et al. 2011; Violante et al. 2009). En este sentido, se han propuesto diversos mecanismos detrás del efecto protector de los polifenoles del olivo/a, especialmente del HT, frente a las

alteraciones del metabolismo lipídico. Algunos de estos mecanismos son una disminución de la expresión de la ruta del factor de transcripción de proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides 1c (SREBP-1c, *siglas en inglés*) y de la enzima ácido graso sintasa (FAS, *siglas en inglés*), la cual es importante en la lipogénesis (Cao et al. 2014). Además, este efecto puede deberse a un aumento en el flujo biliar, en las concentraciones de colesterol biliar y de ácidos biliares, y del subsecuente incremento de la excreción fecal de colesterol y ácidos biliares (Krzeminski et al. 2003). A esto hay que añadir el efecto protector ejercido frente al EO, frecuente en dichos trastornos, a través de la disminución de las especies reactivas, el aumento de las defensas antioxidantes (Cao et al. 2014; Fki et al. 2007) y de la protección ejercida frente a anomalías mitocondriales (Cao et al. 2014).

Estos cambios significativos en el perfil lipídico, tras el consumo de alimentos funcionales o suplementos con extractos de olivo, no se han observado en sujetos sin dislipemias (De Bock, Derraik, et al. 2013; Vázquez-Velasco et al. 2011). Sin embargo, sí se han obtenido tras el consumo de aceites de oliva ricos en polifenoles (Violi et al. 2015; Hernáez et al. 2015; Covas et al. 2006; Estruch et al. 2006), los cuales mejoran especialmente la fracción cHDL (Estruch et al. 2006; Covas et al. 2006; Marrugat et al. 2004). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que la elección de la matriz alimentaria juegue un papel importante en la prevención de las alteraciones metabólicas en sujetos sin dislipemias.

El efecto protector de los polifenoles del olivo, principalmente del HT, frente a las dislipemias se puede observar en estudios como el realizado por Fki y colaboradores en ratas hipercolesterolémicas. En este estudio se evaluó los efectos de un extracto rico en polifenoles del olivo y los efectos del HT en ratas hipercolesterolémicas, a las cuales se les indujo la dislipemia mediante la alimentación con dieta rica en colesterol. Para la realización de este estudio se formaron 6 grupos de 8 ratas cada uno de ellos: el primer grupo fue alimentado con una dieta estándar (control), el segundo grupo fue alimentado con una dieta rica en colesterol sin tratamiento, el tercer y el cuarto grupo fueron alimentados con una dieta rica en colesterol y recibieron el tratamiento con HT en dosis de 2,5 y 5 mg/kg de peso corporal, respectivamente, y el quinto y el sexto grupo fueron alimentados con una dieta rica en colesterol y recibieron el tratamiento con el extracto de olivo en dosis de 5 y 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. La administración de los tratamientos duró 16 semanas. En este estudio se observó tras la administración de HT (dosis de 2,5 mg/kg de peso corporal) en las ratas hipercolesterolémicas, una disminución significativa de los niveles séricos de colesterol total ($p<0,05$) y de cLDL ($p<0,05$), así como un incremento significativo de los niveles de HDL ($p<0,05$) comparado con las ratas

hipercolesterolémicas sin tratamiento. De hecho, estas ratas hipercolesterolémicas tratadas con HT llegaron incluso a niveles séricos de colesterol total y de índice aterogénico comparables con los del grupo control sin dislipemia. En este sentido, el tratamiento más efectivo en ratas con dislipemia para disminuir los niveles de colesterol total y cLDL e incrementar los niveles de cHDL, fue el tratamiento con HT en dosis de 2,5 mg/kg de peso corporal. Seguido del tratamiento con 10 mg/kg de peso corporal de extracto de olivo. Este efecto positivo fue acompañado, tras la administración de las dosis más bajas de HT (2,5 mg/kg de peso corporal) y de las más altas del extracto de olivo (10 mg/kg de peso corporal), de un efecto protector contra la peroxidación lipídica en las ratas hipercolesterolémicas, al observarse una disminución significativa de los niveles de TBARS en diversos órganos comparado con las ratas hipercolesterolémicas sin tratamiento ($p < 0,05$). Incluso en el caso del tratamiento con HT a dosis más bajas, se consiguió mantener los niveles de TBARS, en el hígado y en la aorta, similares a los observados en las ratas control sin dislipemia. Caso similar ocurrió con los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT, *siglas en inglés*) y superóxido dismutasa (SOD, *siglas en inglés*) (Fki et al. 2007).

En el estudio de Cao y colaboradores realizado en ratas con dislipemia, también se puede observar el papel protector del HT frente a las alteraciones del metabolismo lipídico. En este estudio se evaluó el efecto del HT comparado con el de la metformina en ratones que presentaban diversos trastornos metabólicos tras haber sido alimentados con una dieta rica en grasas. En el estudio hubo dos intervenciones paralelas con diferentes grupos cada una de ellas. En la primera intervención se formaron 4 grupos con 10 ratones cada grupo: el primer grupo era alimentado con una dieta estándar de control, el segundo grupo era alimentado con una dieta rica en grasas, el tercer grupo era alimentado con una dieta rica en grasas y tratado con bajas dosis de HT (10 mg/kg/día), y el cuarto grupo fue alimentado con una dieta rica en grasas y tratado con una dosis de HT alta (50 mg/kg/día). En la segunda intervención se dividió a los ratones con diabetes en 3 grupos: en el primer grupo los ratones diabéticos no recibían tratamiento, en el segundo grupo los ratones con diabetes eran tratados con HT (10 mg/kg/día) y en el tercer grupo los ratones diabéticos eran tratados con metformina (225 mg/kg/día). En los ratones de la primera intervención se observó tras la administración de ambas dosis de HT, un descenso significativo en los niveles de cLDL ($p < 0,01$), en la relación cLDL/cHDL ($p < 0,01$), en los niveles de triglicéridos ($p < 0,01$) y en los niveles de ácidos grasos libres ($p < 0,01$), comparado con los ratones sin tratamiento y alimentados con una dieta rica en grasas. También se observaron mejoras significativas en la glucemia e insulinemia tras ambas dosis de HT, en comparación con los

ratones sin tratamiento con trastornos metabólicos. Otras mejoras significativas en el EO, la función mitocondrial y la composición corporal fueron observadas tras el tratamiento con HT en los ratones alimentados con una dieta rica en grasas. En la segunda intervención realizada con ratones diabéticos, se observó un descenso significativo de la glucemia en ayunas tanto al administrar HT como metformina. Por otra parte, el perfil lipídico solo fue mejorado notablemente en estos ratones diabéticos tras la administración de HT y no de metformina (Cao et al. 2014).

En el ensayo clínico cruzado realizado por Carnevale y colaboradores en 30 sujetos con glucemias prediabéticas e hipertrigliceridemias, se observó que, tras el consumo agudo de aceite de oliva virgen extra con la comida, existía un descenso significativo en los niveles postprandiales de triglicéridos ($p=0,002$) y de la apoB-48 ($p=0,002$) comparado con el grupo control que no consumió el aceite junto con la comida. Además, en este estudio se observaron mejoras significativas sobre el perfil glucémico postprandial tras el consumo del aceite de oliva rico en polifenoles (Carnevale et al. 2016).

Sin embargo, otros ensayos clínicos donde se ha observado cambios significativos en el metabolismo lipídico tras el consumo de extractos de olivo, presentan diversas irregularidades y/o efectos adversos (Susalit et al. 2011; Perrinjaquet-Moccetti et al. 2008). Este es el caso del estudio realizado por Susalit y colaboradores en sujetos hipertensos, donde se observó una disminución significativa de los niveles de colesterol total (no se muestran datos en el artículo) y de triglicéridos ($-11,90 \pm 46,17$ mg/dL; $p<0,05$), especialmente en aquellos sujetos con niveles de triglicéridos elevados. En este estudio también se observaron cambios significativos en los niveles de cLDL tras la administración de 1000 mg/día de un suplemento con extractos de olivo con respecto al grupo control (tratado con Captopril) ($-3,89$ vs. $2,14$ mg/dL, respectivamente; $p=0,032$). Además, este tratamiento fue acompañado de una dieta baja en grasas (baja en lípidos totales, en AGS y en colesterol) y en sodio (NaCl $<2,4$ g por día). Estas características dietéticas pudieron afectar a los niveles lipídicos de los sujetos. De hecho, en el estudio realizado anteriormente por Perrinjaquet-Moccetti y colaboradores con el mismo suplemento (EFLA943), se observó cómo los cambios en el estilo de vida producían por sí solos mejoras en el metabolismo lipídico. Y solo el suplemento a dosis de 1000 mg/día produjo cambios significativos en el metabolismo lipídico, mientras que tras la dosis de 500 mg/día no se observaron estos cambios (Perrinjaquet-Moccetti et al. 2008). A esto hay que añadir, que en el estudio de Susalit y colaboradores se encontraron cambios significativos tras el consumo del suplemento en diversos parámetros de seguridad como la ALT ($p=0,016$), la

hemoglobina ($p=0,003$), las plaquetas ($p=0,001$) y el potasio ($p=0,043$), y tendencias en los niveles séricos de cloro ($p=0,072$) y de AST ($p=0,092$), posiblemente debido a las altas dosis del suplemento administradas durante el estudio. Además, no se registraron las dosis ingeridas del suplemento en un 51,4% de los sujetos del estudio. Asimismo, existieron diferencias al inicio entre los grupos de tratamiento en los niveles de colesterol total, cLDL y en el número de sujetos con cifras superiores de cLDL a 130 mg/dL. En este sentido, los valores de estas variables fueron superiores en el grupo asignado al consumo del extracto y los autores no comentan en el artículo haber ajustado el modelo con dichas variables como covariables en el análisis estadístico (Susalit et al. 2011).

Por otra parte, en sujetos sin dislipemias el efecto protector en el perfil lipídico no se ha observado de forma clara cuando estos polifenoles fueron administrados a través de matrices alimentarias diferentes al aceite de oliva (Georgakouli et al. 2016; Vázquez-Velasco et al. 2011) o por separado (De Bock, Derraik, et al. 2013).

Esto se puede observar en el ensayo clínico cruzado realizado por Vázquez-Velasco y colaboradores en 22 sujetos aparentemente sanos (17 mujeres y 6 hombres) con una edad comprendida entre los 20 y 45 años. En este estudio se investigó el efecto sobre diversos biomarcadores CV del consumo de 10-15 g/día de aceite de girasol enriquecido en HT (45-50 mg/día de HT) y se comparó con el efecto producido por el consumo de 10-15 g/día de aceite de girasol sin enriquecer. Durante las 3 semanas que duró cada periodo de intervención, los participantes del estudio debían mantener sus hábitos dietéticos y de actividad física. Dentro de los criterios de exclusión se incluyó el no presentar hipercolesterolemia. En este estudio, no se observaron cambios significativos en las variables lipídicas evaluadas tras la administración de los aceites. Esto puede ser debido a que los sujetos no padecían dislipemia. Lo que sí se observó fue un descenso significativamente mayor de los niveles de cLDLox ($p<0,05$) y un aumento superior de la actividad arilesterasa de PON-1 ($p=0,009$) en aquellos sujetos que consumieron el aceite enriquecido en HT comparado con el aceite de girasol sin enriquecer (Vázquez-Velasco et al. 2011).

Otro estudio donde no se observaron cambios significativos en el perfil lipídico en sujetos sin dislipemias, es el ensayo clínico cruzado realizado por De Bock y colaboradores. Este estudio fue llevado a cabo en 46 hombres con sobrepeso sin dislipemia de mediana edad, a los que se les administró un suplemento con extractos de olivo (9,7 mg/día de HT y 51,1 mg/día de oleuropeína) durante 12 semanas (De Bock, Derraik, et al. 2013).

Sin embargo, este efecto protector en el perfil lipídico en sujetos sin dislipemias sí se ha observado tras el consumo de aceite de oliva rico en polifenoles (Violi et al. 2015; Hernáez et al. 2015; Covas et al. 2006; Marrugat et al. 2004), especialmente en la fracción cHDL (Covas et al. 2006; Marrugat et al. 2004). En este sentido, y como se ha mencionado anteriormente, la matriz en la que van englobados estos compuestos bioactivos puede ser importante a la hora de prevenir la alteraciones metabólicas.

El efecto protector del aceite de oliva rico en polifenoles en sujetos sin dislipemias, se puede observar en el estudio cruzado multicéntrico llamado EUROLIVE realizado en 5 países por Covas y colaboradores. Este estudio fue realizado en 200 hombres aparentemente sanos que consumieron 25 mL/día de tres aceites de oliva con diferente contenido fenólico (aceite con bajo contenido fenólico: 2,7 mg/kg; aceite con medio contenido fenólico: 164 mg/kg y aceite con alto contenido fenólico: 366 mg/kg) durante 3 semanas. Tras la ingesta de los aceites se observó un incremento lineal en los niveles de cHDL en función del contenido fenólico (media de cambio de cHDL en el aceite de bajo contenido fenólico: 0,025 [IC_{95%} 0,003-0,05] mmol/L; media de cambio de cHDL en el aceite de contenido fenólico medio: 0,032 [IC_{95%} 0,005-0,05] mmol/L y media de cambio de cHDL en el aceite de alto contenido fenólico: 0,045 [IC_{95%} 0,02-0,06] mmol/L). También se observó un descenso medio en los niveles de triglicéridos de 0,05 mmol/L tras la ingesta de todos los aceites. Aunque no se observaron cambios significativos en los niveles séricos de cLDL tras el consumo de los aceites, sí existió una mayor resistencia de estas lipoproteínas a la oxidación en el caso de los aceites con contenido fenólico medio y alto (media de cambio de cLDLox en el aceite de bajo contenido fenólico: 1,21 [IC_{95%} -0,8-3,6] U/L; media de cambio de cLDLox en el aceite de contenido fenólico medio: -1,48 [IC_{95%} -3,6-0,6] U/L y media de cambio de cLDLox en el aceite de alto contenido fenólico: -3,21 [IC_{95%} -5,1- -0,8] U/L) (Covas et al. 2006).

Este efecto sobre los niveles de cHDL ($p=0,029$), también se observó en el estudio de Marrugat y colaboradores realizado en 30 sujetos sin dislipemia tras el consumo de un aceite de oliva rico en polifenoles (Marrugat et al. 2004).

El efecto preventivo del consumo de aceite de oliva rico en polifenoles sobre las alteraciones metabólicas en el perfil lipídico, también se ha observado a nivel postprandial. Este efecto puede observarse en el ensayo clínico agudo realizado por Violi y colaboradores en 25 sujetos aparentemente sanos sin dislipemias. En este estudio, se evaluaron dos

intervenciones distintas. En la primera intervención se comparaban los efectos en el metabolismo postprandial del consumo de un aceite de oliva virgen extra (10 g) junto a la comida comparado con los efectos observados en un grupo control que no consumía el aceite junto con la comida. La segunda intervención consistió en comparar entre sí los efectos postprandiales del consumo de un aceite de maíz (10 g) con los observados tras el consumo de un aceite de oliva virgen extra (10 g) junto con la comida. En la primera intervención se observó cómo, tras el consumo del aceite de oliva virgen extra con la comida, descendieron significativamente los niveles postprandiales de cLDL comparado con el grupo control ($p < 0,001$). En la segunda intervención, se observó que, tras el consumo del aceite de oliva virgen extra, existía un descenso significativo en los niveles postprandiales de cLDL comparado con el grupo que consumió el aceite de maíz ($p < 0,05$) (Violi et al. 2015).

Por todo esto, diversos componentes bioactivos de la granada y del olivo/a, como el HT y la PC, podrían ayudar a mejorar las alteraciones del metabolismo glucémico y lipídico, y los efectos colaterales que estos producen en los sujetos que presentan dichas alteraciones metabólicas.

5.7. CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV

Las variables bioquímicas de seguridad son de especial importancia al ser las que evalúan si las dosis administradas durante el estudio producen toxicidad en los sujetos analizados.

En el presente estudio, donde se administró a los sujetos durante 8 semanas un suplemento con extracto de oliva (9,9 mg/día de HT) y de granada (195 mg/día de PC), no se observaron cambios significativos en los parámetros bioquímicos de seguridad (ALT, AST, FA, Creatinina y Urato) tras el consumo del suplemento en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 23-25**). Lo que sí se observó, tras el periodo de intervención con placebo, fue un descenso significativo de los niveles de la fosfatasa alcalina (FA) en la población total (de 81,28 [IC_{95%} 74,54-88,02] a 79,11 [IC_{95%} 73,37-84,84] UI/L; $p = 0,013$). Cabe señalar que pese a esta reducción, los niveles de FA se mantuvieron dentro de los rangos de normalidad (30-120 UI/L) (**Tabla 23**). De esta forma, los sujetos mantuvieron los valores de las variables de seguridad en los rangos de normalidad desde el principio hasta el final del estudio (**Tablas 23-25**).

Por otro lado, no se observaron eventos/efectos adversos ni signos/síntomas de baja tolerancia en los sujetos del presente estudio durante las diversas intervenciones. Es decir, no existieron eventos o efectos adversos reportados por parte de los sujetos o registrados por parte de los médicos e investigadores relacionados con el consumo del suplemento o del placebo, como molestias gastrointestinales, náuseas, diarrea, gases, distensión abdominal, mareos, dolor muscular, dolor de cabeza, fatiga, etc. Tampoco se observaron cambios patológicos en los valores hematológicos, bioquímicos, constantes vitales, exploraciones físicas o el resto de las variables de seguridad analizadas. Esto indica la ausencia de toxicidad y la adecuada tolerabilidad del suplemento durante el estudio en los sujetos evaluados.

En términos generales, el consumo de productos derivados del olivo/a es seguro (EMA 2011). En base a los datos toxicológicos y de seguridad aportados por estudios realizados en seres humanos con extractos de olivo y por lo observado tras el consumo de los productos de este tipo hallados en el mercado, la Agencia Europea del Medicamento (EMA, *siglas en inglés*) describe como *acceptable* su perfil de seguridad y de *bien tolerado* su consumo oral. Esta misma agencia añade que no se han informado hasta el momento de eventos o efectos adversos moderados o graves relacionados con su consumo (EMA 2011).

En este sentido, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) también describe como *acceptable* el perfil de seguridad de los extractos del olivo/a. Esto es debido principalmente, a que la mayoría de los estudios que han evaluado los efectos terapéuticos de los componentes fenólicos del fruto u hojas del olivo, tanto en animales de experimentación como en humanos, no han observado efectos/eventos adversos tras su consumo. Sin embargo, AECOSAN advierte que altas concentraciones de compuestos fenólicos o el estar sometidos estos compuestos a determinadas condiciones ambientales (alto pH y presencia de hierro), podría producir un efecto prooxidante (Lebrero et al. 2015). En este sentido, la EMA desaconseja su uso en mujeres embarazadas, en periodo de lactancia y en niños al considerar que a día de hoy no existen estudios que avalen su administración en estas poblaciones. Además, también incluye a pacientes ancianos o que presenten cálculos biliares, ya que en estos últimos puede precipitar la formación de un cólico biliar. Asimismo, desaconseja su consumo a sujetos que presenten hipersensibilidad conocida a dicha sustancia herbácea o a la familia de plantas o a los excipientes del producto final (EMA 2011).

En lo que respecta concretamente al HT, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *siglas en inglés*) permite declaraciones de salud tales como que el consumo de HT en dosis ≥ 5 mg/día “protege las partículas de LDL del daño oxidativo” (EFSA 2011). A esto hay que añadir que, en los últimos años, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA, *siglas en inglés*) ha aceptado productos con HT para su consumo como aditivos alimentarios, considerando que dicha sustancia es generalmente reconocida como segura (GRAS, *siglas en inglés*) (FDA 2016).

Por otra parte, el consumo de aceite de oliva virgen entre la población española suele ser elevado, siendo dicho producto alimentario rico en HT (De la Torre-Robles et al. 2014). La biodisponibilidad oral del HT a través del consumo de aceite de oliva se estima en un 99%, mientras que la de un extracto es de aproximadamente un 75%. La concentración plasmática máxima (C_{max}) del HT se calcula que se produce a los 32 min de su ingesta (26 µg/L.), siendo su vida media de aproximadamente 2,43 horas. En el plasma y en la orina en HT está presente en un 98% en formas conjugadas, principalmente glucurónidos, lo que sugiere un extenso primer paso intestinal y hepático. La excreción del HT en humanos a las 24 horas se calcula que es de aproximadamente un 31% (Soni et al. 2006).

Respecto a la seguridad de los polifenoles derivados del olivo/a, particularmente del HT, existen diversos estudios y revisiones que han evaluado este tema en profundidad (Auñón-Calles et al. 2013; Soni et al. 2006; Christian et al. 2004). Este es el caso del estudio realizado por Auñón y colaboradores en animales de experimentación, quienes determinaron que la concentración máxima sin observarse efecto adverso (NOAEL, *siglas en inglés*) del HT era de 500 mg/kg/día por vía oral, la cual fue la máxima dosis administrada durante las 13 semanas que duró el estudio (Auñón-Calles et al. 2013).

En el estudio de Christian y colaboradores se analizó la toxicidad aguda de un extracto de olivo en roedores. En este estudio se administró a ratones unas dosis orales de 500, 1.000 o 2.000 mg/kg de extracto de olivo y a ratas unas dosis de 0, 1.000, 1.500 y 2.000 mg/kg de dicho extracto. Tras la administración oral aguda del extracto no se observaron cambios en la mortalidad o en la morbilidad, y no se produjeron signos clínicos anormales o cambios macroscópicos en los tejidos. Estos autores concluyeron que no existían efectos adversos aún en la dosis más elevada en ambos tipos de roedores (NOAEL: 2.000 mg/kg) (Christian et al. 2004).

Resultados muy parecidos obtuvieron los investigadores D'Angelo y colaboradores. Estos autores encontraron que el NOAEL del HT era de 2.000 mg/kg. Durante el estudio, llevado a cabo en ratas, se administraron por vía oral de forma aguda diferentes dosis de HT. Después de 14 días de observación no se obtuvieron cambios en la mortalidad o morbilidad, ni efectos adversos a excepción de una piloerección que empezó a las 2 horas del tratamiento con sonda y desapareció a las 48 horas (D'Angelo et al. 2001).

Respecto a la toxicidad subcrónica evaluada en el estudio de Christian y colaboradores con extracto de olivo, se estableció un NOAEL de 2.000 mg/kg que se corresponde con 120 mg/kg/día de compuestos fenólicos totales ingeridos. El estudio, que no detectó efectos adversos, fue realizado en ratas e incluía la administración durante 90 días de 2.000 mg/kg de extracto de olivo. Durante el estudio, sin embargo, se observaron algunas modificaciones, sin consecuencias tóxicas según alegan sus autores, en parámetros hematológicos y bioquímicos. Por ejemplo, existió una elevación significativa del número de hematíes en las hembras a dosis de 2.000 mg/kg/día, aunque sin verse alterados otros parámetros hematológicos. También se pudo observar un descenso significativo de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) en machos y hembras en todas las dosis administradas, y de la enzima sorbitol dehidrogenasa (SDH) en hembras a dosis de 1.500 y 2.000 mg/kg/día. Sin embargo, el descenso observado en estas enzimas no representó signos de toxicidad y estuvo acompañado de un descenso en los niveles de colesterol. Estos cambios posiblemente indiquen una leve estimulación eritropoyética y un descenso en los niveles de colesterol (Christian et al, 2004).

En este sentido, en algunos estudios en humanos, donde se han administrado dosis elevadas de extracto de olivo (1.000 mg/día), también se han observado cambios en variables hematológicas y bioquímicas (Susalit et al. 2011). Este es el caso del estudio de Susalit y colaboradores donde, tras administrar a sujetos 1.000 mg/día de un suplemento con extractos de olivo, se observaron cambios significativos en diversos parámetros de seguridad. Tras su ingesta durante 8 semanas se observaron alteraciones significativas en la ALT ($p=0,016$), la hemoglobina ($p=0,003$), las plaquetas ($p=0,001$) y el potasio ($p=0,043$). Aunado a ello, se observaron tendencias al cambio en otras variables de seguridad como en los niveles séricos de cloro ($p=0,072$) y de AST ($p=0,092$). Aunque los valores de todos estos parámetros estuvieron dentro de los rangos de normalidad al finalizar el estudio, es importante señalar que se registraron un total de 1057 eventos adversos en 168 sujetos (94,4%), de los cuales 83 sujetos (49,4%) pertenecían al grupo al que se administró el extracto de olivo y 85 (50,6%) al grupo donde se administró el fármaco Captopril. Los

eventos adversos más comunes fueron tos (4,6% en el grupo del extracto de olivo y 7,0% en el grupo de Captopril) y vértigo (5,9% en el grupo del extracto de olivo y 6,3% en el grupo de Captopril). Con menos frecuencia se registraron molestias musculares, dolor de cabeza, fatiga, malestar, mialgia o calambres musculares tras ambos tratamientos. Un evento adverso grave (severa anemia después de una persistente menorragia) fue registrado en el grupo que consumió el extracto de olivo (Susalit et al. 2011).

Por otro lado, respecto a los extractos obtenidos de la granada, la FDA los considera seguros para el consumo humano como aditivos alimentarios (FDA 2003). La granada ha sido extensamente consumida durante siglos en diversas regiones del mundo como fruta y como productos derivados de la misma. A esto hay que añadir que en la mayoría de los estudios realizados en animales de experimentación (Vilahur et al. 2015; Ahmed et al. 2015; McFarlin et al. 2009; Aviram et al. 2008) y en humanos (Sohrab et al. 2017; Hosseini et al. 2016; Hamoud et al. 2014; Mirmiran et al. 2010; Rock et al. 2008; Rosenblat et al. 2006) no se han observado efectos adversos derivados de su consumo.

En el estudio realizado por Patel y colaboradores se evaluó la toxicidad aguda y subcrónica de un extracto de granada (30% de contenido en PC) (Patel et al. 2008). Respecto a la evaluación de la toxicidad aguda del extracto, este estudio se dividió en dos intervenciones. La primera intervención fue diseñada para determinar la dosis letal del extracto para el 50% de la población estudiada (DL50) administrándolo oralmente de forma aguda a diferentes dosis (0, 50, 500 y 5.000 mg/kg de peso corporal). La segunda intervención fue realizada para determinar la DL50 del extracto administrado por vía intraperitoneal (dosis en ratas: 0, 100, 200 y 300 mg/kg/día; dosis en ratones: 0, 100, 150 y 200 mg/kg/día). Este estudio monitorizó durante un periodo de 14 días los signos de morbilidad y la mortalidad tras el consumo oral agudo del extracto. Durante el estudio no se registraron datos de morbimortalidad y los autores determinaron un DL50 >5.000 mg/kg de peso corporal para la administración oral aguda del extracto. Tampoco se registraron efectos tóxicos o anormalidades patológicas en la necropsia de los roedores. Respecto a los efectos de la administración aguda del extracto por vía intraperitoneal, se determinó una DL50 de 217,5 mg/kg de peso corporal en ratas y una DL50 de 187,5 mg/kg de peso corporal en ratones. Diferente a lo observado en la primera intervención, en esta evaluación se observaron signos de lordosis y muerte de roedores tras la administración del tratamiento. La evaluación de la toxicidad subcrónica de este estudio dividió a las ratas en 4 grupos de tratamientos. Cada grupo recibía una dosis de 0, 60, 240 y 600 mg/kg de peso corporal/día del extracto de granada durante 90 días. Dos grupos adicionales recibieron una dosis de 0

y 600 mg/kg/día del extracto durante el mismo periodo de tiempo, pero seguido de una fase de recuperación de 28 días. Cabe señalar que en la evaluación de la toxicidad subcrónica todos los animales sobrevivieron hasta la necropsia. Los exámenes físicos y de comportamiento, no revelaron ningún efecto adverso debido al tratamiento con el extracto comparado con el grupo control. Además, los grupos a los que se administró el extracto de granada no obtuvieron cambios toxicológicos significativos relacionados con el tratamiento en las observaciones clínicas, los exámenes oftalmológicos, el peso corporal, la ganancia de peso corporal, la ingesta de alimentos, las evaluaciones clínicas patológicas o el peso de los órganos. Algunos parámetros hematológicos y bioquímicos séricos sí mostraron cambios significativos a diversas dosis en comparación con el grupo control. Sin embargo, los parámetros se encontraron dentro de los rangos de normalidad, por lo que los autores no consideraron que el extracto ejerciera efecto tóxico. Estos investigadores determinaron un NOAEL de 600 mg/kg de peso corporal/día para la ingesta subcrónica del extracto (Patel et al. 2008).

En el estudio de Cerdá y colaboradores, se realizaron dos intervenciones diferentes en ratas. En la primera intervención, se formaron 6 grupos y se administró a cada uno de ellos una dosis diferente de extracto de cáscara de granada en el pienso (0,5; 2; 5; 10; 20 y al 40%), buscando el límite de palatabilidad y la tolerabilidad del extracto. En la segunda, se formaron 2 grupos: el grupo control (alimentado con una dieta estándar) y el grupo al que se añadió a la dieta un 20% de extracto de cáscara de granada (con un 6% de contenido en PC) durante 37 días. En un estudio anterior se observó cómo en cuestiones de palatabilidad las ratas solo toleraban hasta el 20% del contenido del pienso en extracto de granada, mientras que al 40% disminuía significativamente la palatabilidad del mismo. En la primera intervención del estudio de Cerdá y colaboradores, las ratas fueron incrementando semanalmente el consumo en PC [0,39; 0,54; 1,12; 1,3 y 1,18 g/día durante la primera, segunda, tercera, cuarta (máxima cantidad de PC) y quinta semana, respectivamente]. Tras la máxima ingesta no se observó una máxima concentración de PC en el plasma, esto podría deberse a la saturación del mecanismo de absorción de esta molécula a partir de determinada dosis. Respecto al peso corporal y a la ingesta del pienso de las ratas, se observó una disminución de la ingesta del pienso al que se le añadió extracto de granada comparado con el grupo control, seguramente debido a los cambios de palatabilidad del mismo. Esta disminución de la ingesta se correlacionó directamente con la pérdida de peso, aunque a partir de la tercera semana se observó un incremento considerable en la ingesta del pienso que incluso superó al consumo del mismo por parte del grupo control, conllevando una mejora en el peso corporal. En este estudio no se observaron diferencias

significativas entre el grupo control y el tratado con extracto de granada en los parámetros hematológicos y bioquímicos evaluados, excepto en los niveles de urea y triglicéridos, aunque ambos estuvieron situados dentro de los rangos de normalidad. En el análisis histopatológicos no se observaron cambios en el hígado o en el riñón. Los autores determinaron un NOAEL de ≈ 5 g/kg de peso corporal/día de PC (Cerdá et al. 2003).

El estudio realizado por Heber y colaboradores, evaluó la seguridad del consumo oral de un extracto de granada rico en elagitaninos en humanos. Este estudio se dividió en dos intervenciones. En la primera intervención, se evaluó la seguridad del consumo oral del extracto a diferentes dosis (710 mg/día y 1420 mg/día del extracto de granada) vs. placebo en 64 sujetos con sobrepeso y elevado índice de cintura. En la segunda intervención, se evaluó la actividad antioxidante del extracto en 22 sujetos con sobrepeso (dosis del extracto de granada: 1.000 mg/día) y se comparó con la obtenida en las mediciones basales. En la primera intervención no se observaron efectos o eventos adversos graves, pero hubo 11 eventos adversos leves o moderados (por ejemplo, infecciones de las vías respiratorias superiores) notificadas por 9 de los 64 sujetos, no habiendo diferencias entre los grupos que consumieron el extracto y el grupo control con placebo. Por otra parte, no hubo alteraciones en las variables de seguridad séricas o urinarias. En la segunda intervención se obtuvo una disminución significativa en los niveles de TBARS, contribuyendo así a la mejora del estado oxidativo, y tampoco se observaron cambios en los parámetros bioquímicos de seguridad, ni efectos adversos (Heber et al. 2007).

Respecto al presente estudio, tras la administración del suplemento con extracto de oliva (9,9 mg/día de HT) y de granada (195 mg/día de PC) durante 8 semanas, se obtuvo una elevada tolerabilidad y ausencia de toxicidad al producto al no observarse ni signos/síntomas de baja tolerabilidad, ni efectos/eventos adversos al consumo del mismo. Asimismo, tampoco se observaron cambios en las constantes vitales, exploraciones físicas, parámetros hematológicos y bioquímicos de seguridad (ALT, AST, FA, Creatinina y Urato) ni en el resto de pruebas realizadas a los sujetos del estudio.

5.8. CARACTERÍSTICAS DE LA FUNCIÓN VASCULAR DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV

La Aterosclerosis es la principal causa de ECV (Lönn et al. 2012) y de mortalidad en todo el mundo (Barquera et al. 2015). Por esta razón, es fundamental prevenir el desarrollo y la progresión de esta enfermedad.

La Aterosclerosis se caracteriza por un engrosamiento y endurecimiento de las arterias de mediano y/o gran calibre debido a la formación de placas de ateroma. Esta enfermedad ocurre por la respuesta de la pared del vaso sanguíneo a una lesión crónica multifactorial provocada por diversos FRCV ateroscleróticos (hábito tabáquico, sedentarismo, alimentación poco saludable, consumo nocivo de alcohol, diabetes, dislipemias, HTA, predisposición genéticas de riesgo, edad avanzada, etc.), que conduce a la formación de las placas (WHO 2011b; Inoue & Node 2006). Las placas ateroscleróticas provocan que la superficie interna de los vasos sanguíneos se vuelva irregular, además de ocasionar la pérdida de elasticidad y el engrosamiento de la pared arterial (WHO 2011b). Esto disminuye el espacio luminal de la arteria y dificulta el tránsito del flujo sanguíneo (WHO 2011b). Dicha situación puede causar manifestaciones clínicas (Lahoz & Mostaza 2007) y dar lugar a eventos CV agudos, entre los que se encuentra los ataques cardíacos y el ictus o infarto cerebral (WHO 2011b).

La Aterosclerosis es una enfermedad crónica de lenta progresión, que se desarrolla de forma silenciosa a lo largo de los años en las paredes de las arterias (WHO 2011b). El proceso aterosclerótico suele comenzar en la infancia y en la adolescencia debido al efecto general de numerosos FRCV (WHO 2007; WHO 2011c; WHO 2008). Cuando se manifiestan los síntomas, generalmente a mediana edad, el proceso aterosclerótico suele estar en una fase avanzada. En esta etapa pueden darse lugar eventos CV agudos que se producen de forma repentina y conducen, frecuentemente, a la muerte antes de que se pueda dispensar la atención médica necesaria (WHO 2011b).

Por estas razones, uno de los objetivos principales de la investigación biomédica actual es identificar y tratar los marcadores tempranos de la Aterosclerosis, para así evitar el progreso de esta enfermedad y sus eventos CV (Ciccone et al. 2013). Importantes marcadores tempranos de la Aterosclerosis son la disfunción endotelial (DE) y la preHTA, los cuales nos indican que la integridad arterial no se está manteniendo (Im et al. 2014; Gutiérrez et al. 2013; Kuvín et al. 2001).

La preHTA es un marcador temprano de Aterosclerosis que incrementa el riesgo de morbimortalidad CV (Lewington et al. 2002; Guo et al. 2013; Huang et al. 2014; Wang et al. 2013; Huang et al. 2013; Lehmann et al. 2016). Dicha situación se puede observar en diversos metaanálisis como el realizado por Guo y colaboradores, donde los sujetos con preHTA de 120–129/80–84 mmHg tuvieron un riesgo de desarrollar eventos CV totales de

1,24 [IC_{95%} 1,10-1,39] veces superior que los sujetos que presentaban una presión arterial normal (< 120/80 mmHg). Para el ictus este riesgo fue del 1,35 [IC_{95%} 1,10-1,66] y para el infarto de miocardio del 1,43 [IC_{95%} 1,10-1,86]. Los sujetos con preHTA de 130–139/85–89 mmHg tuvieron un riesgo de desarrollar eventos CV totales del 1,56 [IC_{95%} 1,36-1,78], para el ictus del 1,95 [IC_{95%} 1,69-2,24] y para el infarto de miocardio del 1,99 [IC_{95%} 1,59-2,50]. Siendo el riesgo total para la preHTA de 1,44 [IC_{95%} 1,35-1,53]; 1,73 [IC_{95%} 1,61-1,85] y 1,79 [IC_{95%} 1,45-2,22] de eventos CV totales, ictus e infarto de miocardio, respectivamente (Guo et al. 2013).

En esta línea, el metaanálisis realizado por Huang y colaboradores observó que la preHTA incrementa el riesgo de mortalidad CV global en un 1,28 [IC_{95%} 1,16-1,40], de mortalidad por enfermedad cardíaca en un 1,12 [IC_{95%} 1,02-1,23] y de mortalidad por ictus cerebral en un 1,41 [IC_{95%} 1,28-1,56] (Huang et al. 2014). Dicha situación también se ve reflejada en los resultados obtenidos en el metaanálisis llevado a cabo por Wang y colaboradores, donde la preHTA incrementa el riesgo de ECV en un 55% y el riesgo de mortalidad CV en un 17%. En los hombres este riesgo fue aún superior (68% para la ECV y 18% para la mortalidad CV) (Wang et al. 2013).

Por otra parte, en el metaanálisis realizado por Huang y colaboradores se observó cómo hasta la preHTA más baja (120–129/80–84 mmHg) incrementaba en un 46% el riesgo de desarrollar ECV (RR=1,46; IC_{95%} 1,32-1,62) comparado con una presión arterial normal (< 120/80 mmHg) (Huang et al. 2013).

A esto hay que añadir que la preHTA suele evolucionar con frecuencia a HTA (De Marco et al. 2009; Vasan et al. 2001), aumentando así aún más el riesgo de morbimortalidad CV (Stamler et al. 1993; Benetos et al. 2001; Benetos et al. 2002; Miura et al. 2001; Sesso et al. 2000). En este sentido, se ha observado en diversos estudios, entre los que se encuentran el Strong Heart Study y el Framingham Study, cómo un alto porcentaje de sujetos con preHTA aparentemente sanos (38% y 37,3%, respectivamente) progresaba a HTA en un periodo de 4 años (De Marco et al. 2009; Vasan et al. 2001). Además, estos autores observaron cómo los valores basales de PAS se comportan como un predictor independiente de la incidencia de HTA, aumentando considerablemente el riesgo de padecerla cuando PAS incrementa en 10 mmHg sus valores (De Marco et al. 2009).

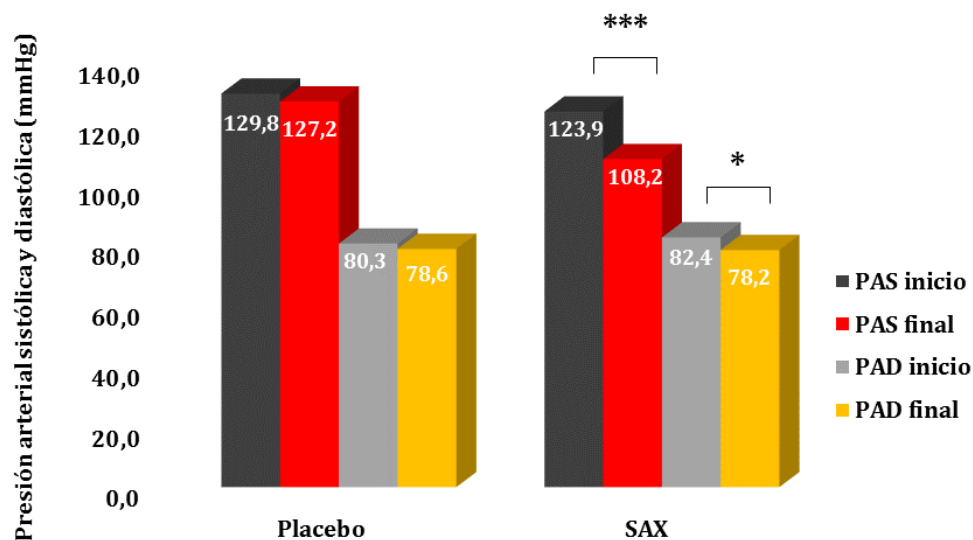
Esto es de vital importancia, ya que la HTA es considerada como uno de los FRCV más importantes a nivel mundial, al ser la causante del 62% de los accidentes cerebrovasculares

y del 49% de los ataques cardíacos (WHO 2002; WHO/ISH 2003; WHO/ISH 2004). Además, la HTA es controlada de manera inadecuada de forma habitual (WHO/ISH 2003) y los fármacos antihipertensivos producen, de forma frecuente, efectos adversos que provocan a menudo el abandono del tratamiento por parte del paciente (Thomopoulos et al. 2016). Siendo la monoterapia insuficiente en la mayoría de los casos (WHO/ISH 2003; Thomopoulos et al. 2016).

Por todo esto, el desarrollo de estrategias de intervención precoces es clave para evitar que evolucione la preHTA y se instaure la HTA, pero por ahora entidades tan importantes en esta área como el Comité Nacional de los Estados Unidos de América sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC 8, *siglas en inglés*), la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH, *siglas en inglés*) y la Sociedad Europea de Cardiología (ESC, *siglas en inglés*) no apoyan que deban basarse estas terapias en tratamientos farmacológicos antihipertensivos (James et al. 2014; Guiseppe Mancia et al. 2013).

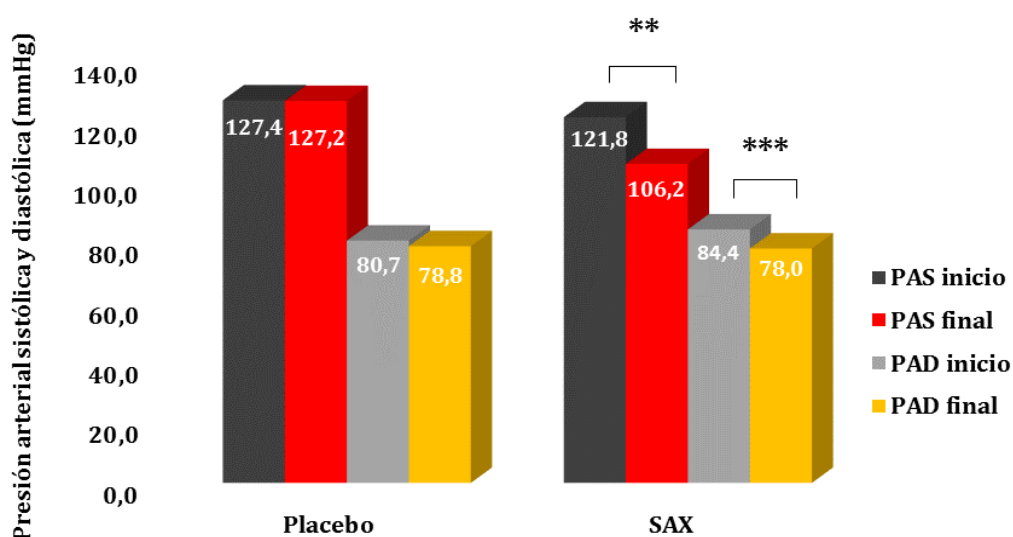
En este sentido, en el presente estudio se observó tras el consumo del Suplemento (SAX) una disminución significativa tanto de la PAS como de la PAD en los sujetos que padecían preHTA o HTA. Incluso se consiguió, tras dicho periodo de intervención, que estos sujetos alcanzaran una presión arterial normal. No observándose estos efectos tras el periodo de intervención con Placebo (**Tablas 35 y 36; Gráficas 4 y 5**).

Gráfica 4. Inicio y fin de la PAS y PAD en los sujetos con preHTA sistólica o HTA sin tratamiento farmacológico en las diversas intervenciones.



Efecto del consumo del Suplemento ($p < 0,05$, *** $p < 0,001$; Modelo lineal mixto).*

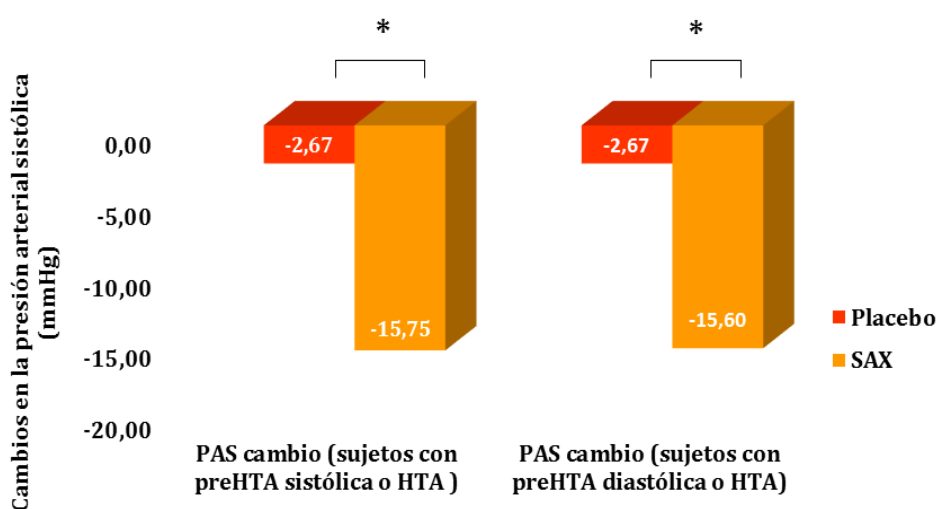
Gráfica 5. Inicio y fin de la PAS y PAD en los sujetos con preHTA diastólica o HTA sin tratamiento farmacológico en las diversas intervenciones.



*Efecto del consumo del Suplemento (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Modelo lineal mixto).*

Cabe destacar la existencia de diferencias significativas entre ambos periodos de intervención en los valores de PAS en los sujetos con preHTA o HTA al final del estudio. Observándose un descenso significativamente superior en PAS tras el consumo del Suplemento comparado con Placebo (**Tablas 35 y 36; Gráfica 6**).

Gráfica 6. Diferencias en la PAS en los sujetos con preHTA sistólica o diastólica o HTA entre las diversas intervenciones.



Diferencias en el efecto tras el consumo del Suplemento y del Placebo ($p < 0,05$; Modelo lineal mixto).*

Esta mejora de la presión arterial tras el consumo del suplemento con HT y PC en los sujetos que padecen de preHTA o HTA, podría proporcionar efectos protectores frente a la Aterosclerosis. Debido a que una adecuada presión arterial (PAS: 119-105 mmHg y PAD: 79-60 mmHg) produce efectos beneficiosos sobre la salud CV (WHO 2013). No obteniéndose asociación directa con la mortalidad CV cuando los valores de la presión arterial se sitúan por debajo de 115/75 mmHg (Lewington et al. 2002).

Dicha mejora de la presión arterial también se ha podido observar en otros estudios que han utilizado alimentos, alimentos funcionales o suplementos ricos en estas moléculas bioactivas (Lockyer et al. 2016; Medina-Remón et al. 2014; Aviram et al. 2004; Shao et al. 2016; Tsang et al. 2012). A este respecto, incluso la Agencia Europea del Medicamento (EMA, siglas en inglés) ha reconocido la acción hipotensora de los extractos provenientes del olivo/a (EMA 2011). Este efecto se puede observar en el ensayo cruzado de Lockyer y colaboradores, donde se administró a sujetos con preHTA un suplemento con HT y

oleuropeína. En este estudio se obtuvo tras el consumo del suplemento una mejora significativa de la PAS ($-3,95 \pm 11,48$ mmHg; $p=0,027$) y de la PAS de 24 horas ambulatoria ($-3,33 \pm 10,81$ mmHg; $p=0,045$), así como de la PAD ($-3,00 \pm 8,54$ mmHg; $p=0,025$) y de la PAD de 24 horas ambulatoria ($-2,42 \pm 7,61$ mmHg; $p=0,039$) en comparación con el control (Lockyer et al. 2016).

En el estudio realizado por Moreno-Luna y colaboradores, se observó cómo el consumo de aceite de oliva rico en polifenoles (~ 30 mg/día) durante 2 meses podía disminuir la presión arterial y mejorar la función endotelial en mujeres jóvenes con preHTA o HTA en estadio 1 (Moreno-Luna et al. 2012). En el estudio PREDIMED se observó en los sujetos con alto RCV (77% con HTA) una reducción significativa tanto de la PAS (-5.79 mmHg; $p<0,05$) como de la PAD (-3.43 mmHg; $p<0,01$) después de la intervención dietética con dieta mediterránea enriquecida con aceite de oliva virgen extra (rica en HT) comparada con la dieta control. Dichos resultados se obtuvieron a pesar de ajustar el análisis por la presión arterial de base, cambios en el plasma del óxido nítrico (NO, *siglas en inglés*), género, edad, IMC, hábito tabáquico, actividad física, medicamentos consumidos (antihipertensivos, hipolipemiantes, etc.) y/o suplementos, niveles plasmáticos de sodio y de potasio, energía dietética total consumida y el porcentaje de AGS, AGM y AGP aportados diariamente. Además, estos cambios se asociaron con un aumento significativo de la excreción urinaria de polifenoles y con un aumento en los niveles plasmáticos de NO (Medina-Remón et al. 2014). El mismo efecto se observó en otro ensayo clínico cruzado realizado en 40 hombres con enfermedad coronaria estable (47,5% con HTA) a los que se les administró durante el estudio 2 aceites de oliva con diferente contenido fenólico (uno de ellos poseía un contenido fenólico de 14,7 mg/kg y el otro de 161,0 mg/kg). La presión arterial sistólica disminuyó en dichos sujetos solo después del consumo del aceite de oliva con alto contenido fenólico (Fitó et al. 2005).

Este efecto hipotensivo también se ha observado en diferentes estudios o metaanálisis donde se ha utilizado PC o alimentos ricos en este polifenol (Sahebkar et al. 2017; Shao et al. 2016; Tsang et al. 2012). Este es el caso del metaanálisis realizado por Sahebkar y colaboradores, donde se investigaron los efectos del consumo de zumo de granada sobre la presión arterial. En dicho metaanálisis se observó una reducción significativa, tras el consumo de zumo de granada, tanto de la PAS [media de cambio: $-4,96$ [IC_{95%} $-7,67$ - $-2,25$] mmHg; $p<0,001$) como de la PAD (media de cambio: $-2,01$ [IC_{95%} $-3,71$ - $-0,31$] mmHg; $p=0,021$). Los efectos sobre la PAS se mantuvieron estables a los análisis de sensibilidad, reduciéndose la PAS a pesar de la duración del tratamiento (>12 semanas; media de cambio: $-4,36$ [IC_{95%} $-7,89$ - $-0,82$] mmHg; $p=0,016$) y (<12 semanas; media de cambio: $-5,83$ [IC_{95%} -

10,05- -1,61] mmHg; $p=0,007$), y de la dosis consumida de zumo de granada por día (>240 cc; media de cambio: -3,62 [IC_{95%} -6,62- -0,63] mmHg; $p=0,018$) y (<240 cc; media de cambio: -11,01 [IC_{95%} -17,38- -4,65] mmHg; $p=0,001$) (Sahebkar et al. 2017).

En el ensayo clínico cruzado realizado por Tsang y colaboradores en sujetos con alto RCV y valores medios de preHTA, se observó cómo el consumo de 500 mL/día de zumo de granada durante 4 semanas produjo una disminución significativa comparado con Placebo tanto de la PAS (de $136,4 \pm 6,3$ a $128,9 \pm 5,1$ mmHg; $p=0,034$) como de la PAD (de $80,3 \pm 4,29$ a $75,5 \pm 5,17$ mmHg; $p=0,031$) (Tsang et al. 2012). En el estudio realizado por Aviram y colaboradores en pacientes con tratamiento antihipertensivo y estenosis severa asintomática de la arteria carotídea, se observó una reducción del 12% en la PAS después de 1 año de intervención consumiendo 50 mL/día de zumo de granada (Michael Aviram et al. 2004). En otro estudio realizado por Shao y colaboradores, se observó que la PC administrada oralmente en dosis de 15 y 45 mg/kg/día disminuyó la presión arterial pulmonar en ratas con HTA pulmonar (Shao et al. 2016).

En lo referente a la FC en reposo en el presente estudio, no se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 26-28**). De este modo, se mantuvo a lo largo del estudio dentro de los rangos de normalidad (60-100 lpm) y por debajo de los valores indicados recientemente por la literatura como de RCV (>80 lpm).

Respecto a la disfunción endotelial (DE), es bien conocido su papel crítico en todo el proceso aterosclerótico (Gutiérrez et al. 2013; Ribeiro et al. 2009; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001). La DE es un estado fisiopatológico sistémico clave tanto para la iniciación, como para la progresión y las complicaciones de la Aterosclerosis (**Ilustración 13**) (Cahill & Redmond 2016; Gutiérrez et al. 2013; Ribeiro et al. 2009; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001). A este respecto, cabe destacar cómo incluso influye significativamente en la transición de un estado estable de ECV a uno inestable, con los riesgos que esto implica (Deanfield et al. 2007).

La DE es considerada como un marcador temprano de la Aterosclerosis y un fuerte predictor de eventos CV tanto en sujetos sintomáticos de ECV (Xu et al. 2014; Ras et al. 2013) como en sujetos asintomáticos (Shechter et al. 2014; Shechter et al. 2009; Corrado et al. 2008). En este sentido, algunos autores consideran a la DE como el mejor predictor independiente de eventos CV a largo plazo en sujetos asintomáticos de ECV o

aparentemente sanos, en comparación con FRCV tradicionales (Shechter et al. 2014; Shechter et al. 2009).

De esta forma, el estudio de la función endotelial en la investigación clínica se considera un punto clave en la evaluación del RCV (Cahill & Redmond 2016; Shechter et al. 2014; Xu et al. 2014; Ras et al. 2013; Gutiérrez et al. 2013; Shechter et al. 2009; Yeboah et al. 2009; Bonetti et al. 2003; Kuvin et al. 2001). Además, hay que destacar el carácter reversible de la DE y la existencia de herramientas diagnosticas no invasivas para su evaluación (Bonetti et al. 2003; Verma et al. 2003).

Entre las herramientas diagnosticas empleadas para evaluar la función endotelial destacan las técnicas de imagen, entre las que se encuentra la dilatación mediada por flujo (DMF) arterial. En la actualidad, la DMF es el método más comúnmente utilizado para su evaluación, principalmente por su sensibilidad y carácter no invasivo (Arrebola-Moreno et al. 2012; Charakida et al. 2010). Esta prueba se basa en la liberación endotelial de NO y otros factores relajantes derivados del endotelio, en respuesta a un aumento de la fuerza de cizallamiento tangencial.

El poder predictor de eventos CV de la función endotelial evaluada por la DMF ha sido observado en diversos metaanálisis como el realizado por Xu y colaboradores, donde se observó cómo la función endotelial se comportaba como un predictor independiente de eventos CV y de mortalidad global. En este estudio los sujetos con ECV establecida disminuyeron entre un 10% y un 14% el riesgo de eventos CV y mortalidad global por cada incremento del 1% de la DMF. La disminución del riesgo del 14% se observó en los estudios donde se ajustaba por los diversos FRCV tradicionales incluidos en el test de Framingham (Xu et al. 2014). En el metaanálisis realizado por Ras y colaboradores, se observó un descenso del RCV del 13% por cada incremento del 1% de la DMF en sujetos con ECV establecida. De hecho, se observó una asociación inversamente proporcional y significativa entre la función endotelial y los eventos CV (Ras et al. 2013). En otro metaanálisis llevado a cabo por Inaba y colaboradores, se obtuvo el mismo descenso del 13% del riesgo de sufrir eventos CV por cada incremento del 1% de la DMF. Este descenso se acentuó aún más cuando se tuvo en consideración la desviación estándar, descendiendo el riesgo de eventos CV hasta en un 41% por cada incremento del 1% de la función endotelial. Lo contrario sucedió cuando la DMF disminuyó en un 1%, produciendo un incremento del RCV de entre el 13% y el 41%. Este metaanálisis concluyó que eran consistentes las asociaciones establecidas entre la función endotelial y los eventos CV en todos los subgrupos evaluados (Inaba et al. 2010).

Por otro lado, en el metaanálisis realizado por Yeboah y colaboradores se observó que la función endotelial evaluada por la DMF era un predictor de eventos CV en adultos aparentemente sanos o asintomáticos. Estos mismos autores reclasificaron correctamente al 52% de los sujetos en la categoría adecuada de RCV, al añadir la función endotelial a la evaluación del RCV realizada con los FRCV tradicionales (Yeboah et al. 2009). En el estudio realizado por Van den Oord y colaboradores, se observó la importancia de la recalificación del RCV a través de técnicas de imagen no invasivas en sujetos aparentemente sanos. Esto es debido a que el 88% de estos sujetos presentaron lesiones ateroscleróticas y la gran parte no fueron detectados mediante la evaluación con FRCV tradicionales. Dichos autores tuvieron que recalificar a los sujetos de alto RCV de un 11% (sujetos pronosticados de alto RCV mediante la evaluación de FRCV tradicionales) a un 79% (sujetos pronosticados de alto RCV mediante técnicas de imagen no invasivas) (Van den Oord et al. 2013).

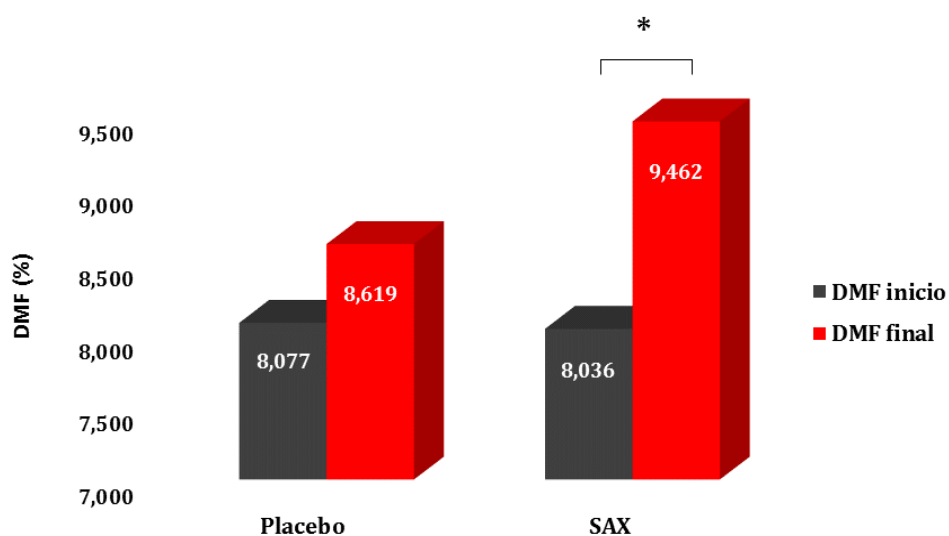
En otros estudios como el llevado a cabo por Corrado y colaboradores, se observó que en sujetos con DE aparentemente sanos o asintomáticos para ECV existía un aumento significativo del riesgo de sufrir eventos CV (Corrado et al. 2008). Además, en este estudio se obtuvo una asociación inversamente proporcional y significativa entre la función endotelial evaluada mediante la DMF y el grosor de la capa intima-media de las arterias carotídeas ($p=0,003$), además de con la PAS ($p<0,001$) y con la edad ($p=0,001$). Este estudio tuvo una duración de 24 meses y se registró en un 29% de la población eventos CV a pesar de que los sujetos eran aparentemente sanos o asintomáticos de ECV. Los únicos predictores de eventos CV globales fueron la presencia de lesiones ateroscleróticas carotídeas ($OR=3,5$; $IC_{95\%}$ 1,4-9,6; $p=0,02$), la DE ($OR=3,2$; $IC_{95\%}$ 1,2-8,3; $p=0,03$) y el género masculino ($OR=1,6$; $IC_{95\%}$ 1,1-6,3; $p=0,005$), mientras que no lo fueron los FRCV tradicionales. En los eventos CV, excluyendo los cerebrovasculares, los únicos predictores fueron la presencia de lesiones carotídeas ($OR=5,5$; $IC_{95\%}$ 1,1-25,8; $p=0,03$) y la DE ($OR=3,8$; $IC_{95\%}$ 1,3-11,1; $p=0,01$). Además, en los sujetos con una función endotelial baja ($DMF \leq 13,5\%$) hubo una mayor prevalencia de FRCV tradicionales como la HTA, la diabetes mellitus, la obesidad, el hábito tabáquico, etc. (Corrado et al. 2008).

En otro estudio realizado en sujetos aparentemente sanos o asintomáticos, se observó una frecuencia de eventos CV del 11,8% entre los sujetos con una $DMF \leq 10,7\%$, mientras que la frecuencia en los sujetos con una $DMF > 10,7\%$ fue del 4,7%; siendo la diferencia entre ambos significativa ($p=0,007$). En este estudio se consideró a la función endotelial evaluada por la DMF como el mejor predictor independiente a largo plazo de eventos CV en sujetos asintomáticos de ECV en comparación con los diversos FRCV tradicionales ($OR=2,70$; $IC_{95\%}$

1,16-6,32; $p=0,011$) (Shechter et al. 2009). Esta misma situación fue observada en otro estudio realizado por el mismo autor, donde se obtuvo una frecuencia de eventos CV del 15,2% en los sujetos con una DMF $\leq 11,3\%$ mientras que la frecuencia en los sujetos con un DMF $>11,3\%$ fue de tan solo el 1,2%, habiendo entre ambos grupos diferencias significativas ($p=0,0001$). En este sentido, fue nuevamente la función endotelial el mejor predictor independiente de eventos CV a largo plazo en sujetos aparentemente sanos o asintomáticos ($OR=2,93$; $IC_{95\%}$ 1,28-6,68; $p<0,001$), en comparación con los diversos FRCV tradicionales y con la evaluación realizada por el test de Framingham (Shechter et al. 2014).

En este aspecto, es importante señalar que en el presente estudio se observó un incremento significativo de la función endotelial evaluada por la DMF del 1,427% tras el consumo del Suplemento ($p<0,05$). No produciéndose este efecto tras el periodo de intervención con Placebo (Tabla 26; Gráfica 7).

Gráfica 7. Inicio y fin de la función endotelial evaluada por la DMF en la población total en función del tratamiento.



Efecto del consumo del Suplemento ($p<0,05$; Modelo lineal mixto).*

Como se ha visto anteriormente, la función endotelial resulta fundamental para evaluar el RCV del sujeto (ESC/EAS 2016; Yeboah et al. 2009; Inaba et al. 2010; Bonetti et al. 2003; Gutiérrez et al. 2013; Ras et al. 2013; Kuvín et al. 2001; Shechter et al. 2009), tanto en sujetos sintomáticos de ECV (Ras et al. 2013; Xu et al. 2014) como en sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos (ESC/EAS 2016; Shechter et al. 2009; Shechter et al. 2014; Corrado

et al. 2008). En estos últimos resulta especialmente importante, ya que se estima que entre un 40 y 80% de los sujetos aparentemente sanos o asintomáticos padecen enfermedad aterosclerótica (Ray et al. 2015). Siendo su detección una prioridad para la prevención primaria CV al ser considerados de alto RCV (Lobos et al. 2008; Ian Graham et al. 2007).

En este sentido, a los sujetos de mediana y avanzada edad se les debe prestar una especial atención, incluso cuando presentan pronóstico de bajo RCV emitido mediante la evaluación con FRCV tradicionales, debido a que el avance de la edad altera la estructura/función vascular de forma independiente a otros factores, siendo la edad *per se* un predictor de DE (Ciccone et al. 2013; Ryliskyte et al. 2004). Esa degeneración de la función endotelial se ha observado que se produce en los hombres a partir de los 40 años y en las mujeres una vez instaurada la menopausia (Ciccone et al. 2013).

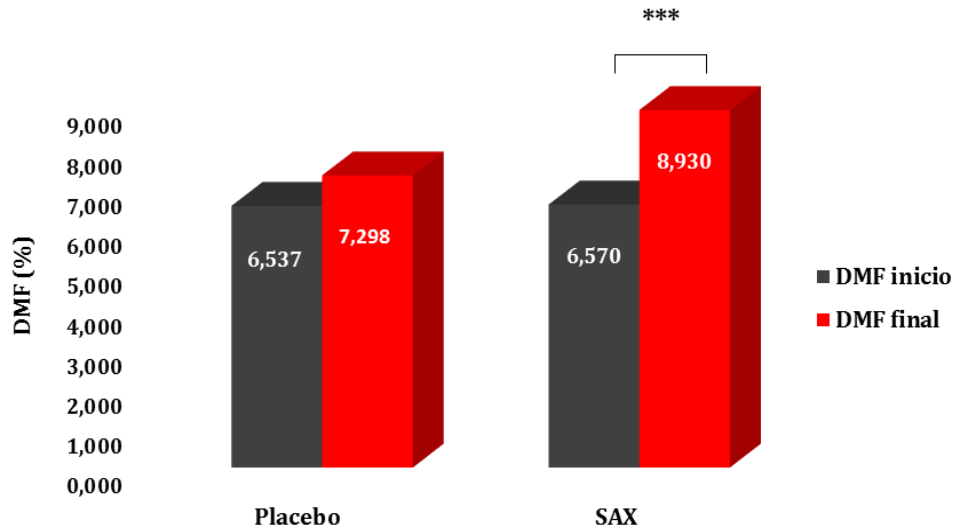
A este respecto, en el presente estudio se observó cómo una nada despreciable cifra del 70,2% de la población de mediana edad aparentemente sana y asintomática de ECV presentó DE al inicio del estudio. De este modo, estos sujetos pasaron de tener un bajo RCV, pronosticado por la evaluación de FRCV tradicionales a través de diversos modelos o tablas (**Cuadro 12**), a presentar un elevado riesgo de sufrir eventos CV (Shechter et al. 2009; Shechter et al. 2014; Corrado et al. 2008; Yeboah et al. 2009).

Cuadro 12. Cálculo del RCV de la población del presente estudio de padecer un evento CV en 10 años mediante la evaluación de FRCV tradicionales.

Tablas de uso internacional				Tablas calibradas para población española	
Framingham Clásico	Framingham por Categorías	SCORE	OMS - WHO/ISH	REGICOR	SCORE
3,127%	2,759%	0,359%	< del 10%	2%	1%-2%

En este sentido, es importante señalar que tras el consumo del Suplemento estos sujetos con DE experimentaron un incremento significativo de la función endotelial del 2,360% ($p < 0,001$). No observándose dicha mejora tras el periodo de intervención con Placebo (**Tabla 27; Gráfica 8**).

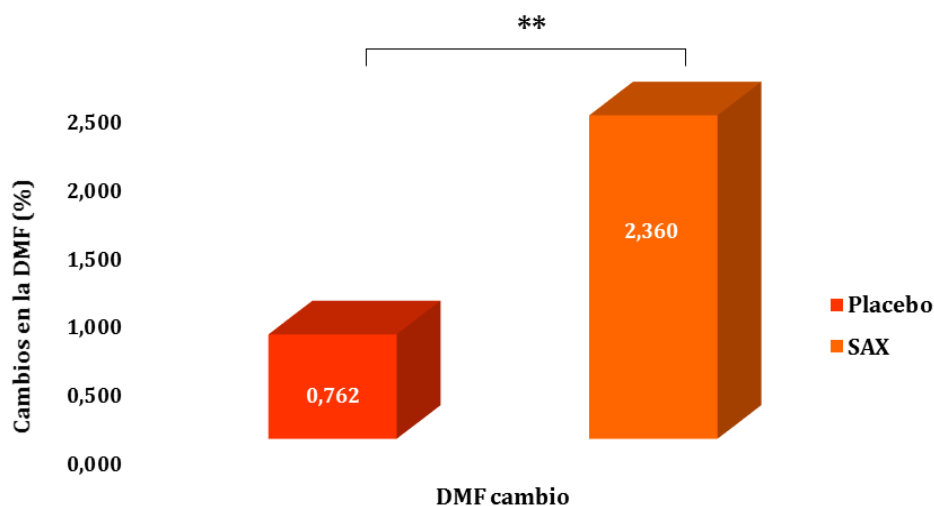
Gráfica 8. Inicio y fin de la función endotelial evaluada por la DMF en los sujetos con DE tras las diversas intervenciones.



*Efecto del consumo del Suplemento (** $p < 0,001$; Modelo lineal mixto).*

Asimismo, esta mejora de la función endotelial en los sujetos con DE fue significativamente superior tras el consumo del Suplemento comparado con Placebo (SAX: 2,36 vs. Placebo: 0,76%; $p < 0,01$) (Tabla 27; Gráfica 9).

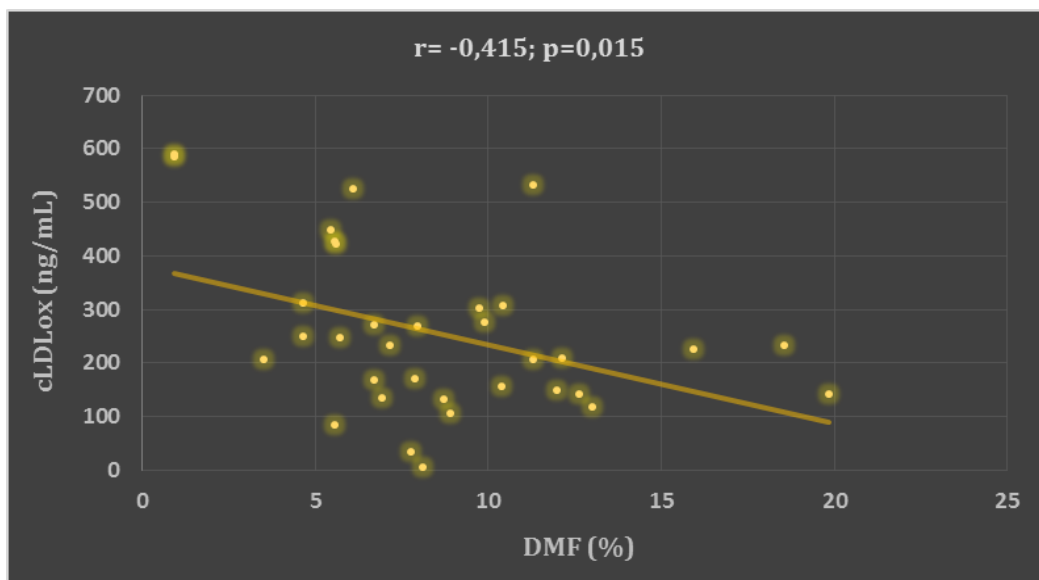
Gráfica 9. Diferencias en la función endotelial evaluada por la DMF en los sujetos con DE entre las diversas intervenciones.



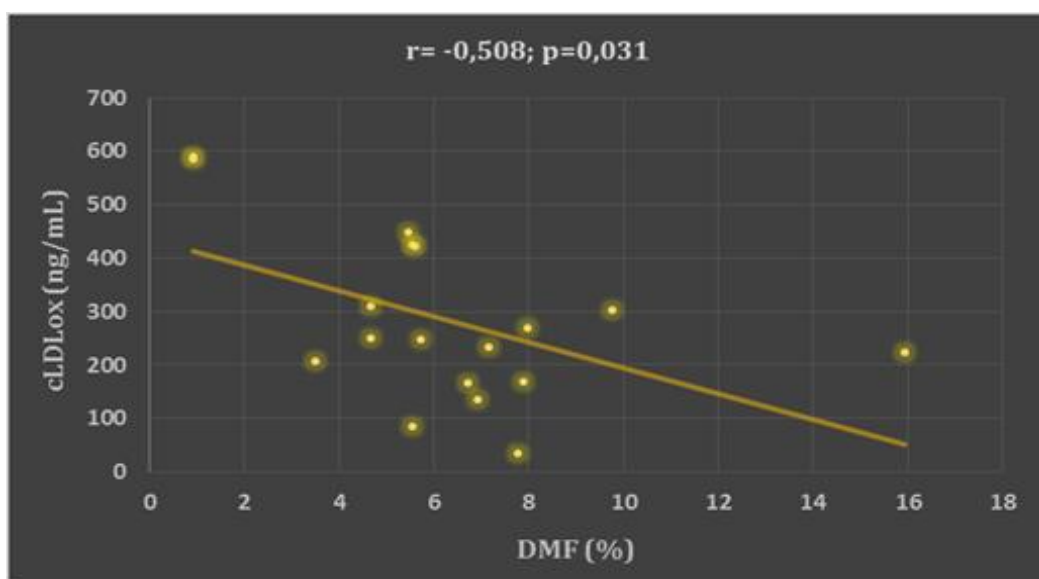
*Diferencias en el efecto tras el consumo del Suplemento y del Placebo (** $p < 0,01$; Modelo lineal mixto).*

Las mejoras obtenidas en la función endotelial en el presente estudio, también han sido observadas en diversos ensayos clínicos realizados con alimentos ricos en estas biomoléculas (Valls et al. 2015; Moreno-Luna et al. 2012; de Nigris et al. 2007; de Nigris et al. 2005), y en estudios con animales de experimentación o *in vitro* que emplearon HT (Zrelli, Matsuoka, Kitazaki, Araki, et al. 2011; Zrelli et al. 2013; De Bock, Derraik, et al. 2013) o PC (Vilahur et al. 2015; De Nigris et al. 2007; Chen et al. 2008). A este respecto, diversos autores sugieren una posible asociación entre las mejoras observadas en la función endotelial y el descenso obtenido en los niveles de cLDLox (Gradinaru et al. 2015; Valls et al. 2015). Esta relación se ha podido constatar en el presente estudio, al establecerse una asociación inversamente proporcional entre la función endotelial y los niveles circulantes de cLDLox en los sujetos que padecían niveles elevados circulantes de cLDLox ($r = -0,415$; $p = 0,015$) (**Gráfica 10**). Acentuándose aun más esta asociación cuando los sujetos presentaban además DE ($r = -0,508$; $p = 0,031$) (**Gráfica 11**).

Gráfica 10. Correlación inversamente proporcional entre los niveles circulantes de cLDLox y la función endotelial en los sujetos con elevados niveles circulantes de cLDLox.



Gráfica 11. Correlación inversamente proporcional entre los niveles circulantes de cLDLox y la función endotelial en los sujetos con elevados niveles circulantes de cLDLox y DE.



Dicho vínculo también se ha observado en diversos estudios como el ensayo cruzado realizado por Valls y colaboradores, donde se administró una única dosis de 30 mL de dos tipos de aceites de oliva [uno enriquecido con sus propios polifenoles (FVOO con 961 mg/kg de contenido fenólico) y el otro sin enriquecer (VOO con 289 mg/kg de contenido fenólico)] en sujetos con preHTA y HTA en estadio 1. En este estudio se observó, después de 5 horas de la ingesta de FVOO, un incremento significativo de la función endotelial en comparación con lo observado tras el consumo de VOO ($p<0,05$). Además, tras la ingesta de FVOO se produjo una disminución de los niveles circulantes de cLDLox ($p=0,010$), estableciéndose una asociación inversa entre los niveles circulantes de cLDLox y la función endotelial ($p=0,01$) (Valls et al. 2015). En el ensayo clínico cruzado realizado por Moreno-Luna y colaboradores, se administró en mujeres jóvenes con preHTA o HTA en estadio 1 dos tipos de aceites de oliva [uno rico en polifenoles (~ 30 mg/día) y el otro refinado sin contenido fenólico]. En este estudio se observó cómo el aceite de oliva rico en polifenoles incrementó significativamente la función endotelial ($p<0,001$) y disminuyó los niveles circulantes de cLDLox ($p<0,01$) (Moreno-Luna et al. 2012).

En el estudio realizado por Vilahur y colaboradores, llevado a cabo en cerdos alimentados durante 10 días con dieta normocolesterolémica o hipercolesterolémica, se administró a la mitad de cada grupo un suplemento con PC (200 mg PC/día). En este estudio se observó cómo los cerdos con dislipemia que tomaron el suplemento con PC evitaron el daño endotelial producido por este trastorno, manteniendo una función endotelial comparable con la de los cerdos normocolesterolémicos. Este beneficio fue asociado con una mayor activación vascular de la ruta Akt/eNOS, una menor expresión de MCP-1 y una mayor resistencia a la oxidación de las cLDL (Vilahur et al. 2015).

Asimismo, en el presente estudio se observó una mejora simultánea de la función endotelial ($p<0,05$) (**Tabla 26**) y de los niveles circulantes de cLDLox tras el consumo del Suplemento ($p<0,05$) (**Tabla 29**).

Por otro lado y como se ha visto anteriormente, la DE está asociada tanto a la preHTA (Kissel & Anderson 2012; Giannotti et al. 2010) como a la HTA (Cantalupo et al. 2015). De hecho, la DE es considerada un evento temprano que contribuye a la desregulación del tono vascular (Vanhoutte 1996; Taddei & Salvetti 1996; Taddei et al. 1996). En este sentido, la DE podría ser la predecesora del desarrollo de la presión arterial elevada y participar en su patogenia (Bautista 2003). En este aspecto, estudios como el Framingham Heart Study han observado una importante asociación entre la DE y el aumento de la PAS (Thanassoulis et al. 2012).

Este estudio concluyó que el empeoramiento de la función vascular global, provocada por un aumento en la rigidez vascular y a un empeoramiento de la función endotelial, podía contribuir a exagerar la respuesta de la presión arterial incrementando así el RCV del sujeto (Thanassoulis et al. 2012).

A este respecto, cabe destacar que en el presente estudio se observó que, tras el consumo del Suplemento, los sujetos con DE mejoraron conjuntamente la función endotelial ($p<0,001$) y los valores de la PAS ($p<0,01$). Este efecto protector de la salud vascular no se observó tras el periodo de intervención con Placebo (**Tabla 27**).

Además, la DE es un predictor de eventos CV en sujetos con HTA (Modena et al. 2002; Perticone et al. 2001). Referente a lo cual, algunos autores alegan cómo la mejora de la función endotelial proporciona un mejor pronóstico frente a los eventos CV en sujetos hipertensos, de forma independiente, a los FRCV tradicionales incluida la presión arterial (Modena et al. 2002).

Este poder predictor de eventos CV de la función endotelial en sujetos con HTA se puede observar en diversos estudios (Modena et al. 2002; Perticone et al. 2001). Entre los que encuentra el realizado por Perticone y colaboradores, dónde la función endotelial predecía eventos CV en sujetos con HTA esencial, obteniéndose una tasa de eventos por cada 100 sujetos/año para el tertil más bajo de función endotelial de 8,17; para el tertil medio de función endotelial de 4,34 y para el tertil más alto de función endotelial de 2,02. El riesgo de eventos CV asociado al tertil más bajo de la función endotelial fue significativo ($HR=2,08$; $IC_{95\%}$ 1,25-3,48; $p=0,005$), aún después de controlar diversos marcadores de riesgo individuales incluyendo la presión arterial (Perticone et al. 2001). Este comportamiento se puede observar también en el estudio realizado por Modena y colaboradores, donde la función endotelial evaluada por la DMF fue un predictor de eventos CV y de mortalidad en mujeres postmenopáusicas con HTA (Modena et al. 2002). En este estudio las mujeres postmenopáusicas con HTA controlada mediante terapia farmacológica antihipertensiva que presentaron una DMF $>10\%$, aumentaron significativamente el porcentaje de supervivencia libre de eventos CV en comparación con las que presentaron una DMF $\leq 10\%$. En este sentido, se observaron 32 eventos CV en las mujeres con una función endotelial $\leq 10\%$ (tasa de eventos CV: 3,50 por 100 sujetos/año) mientras que solo se observaron 15 eventos en las mujeres con una función endotelial $>10\%$ (tasa de eventos CV: 0,51 por 100 sujetos/año) con la misma tensión arterial, habiendo entre ambos grupos diferencias significativas ($p<0,001$). Los autores concluyeron que la mejora de la función endotelial

proporciona un mejor pronóstico frente a los eventos CV en mujeres postmenopáusicas con HTA, de forma independiente a los FRCV tradicionales incluida la presión arterial. Además, añadieron cómo los pacientes con HTA que no normalicen su función endotelial deben ser considerados de alto RCV y por lo tanto, se les debe aplicar terapias más agresivas (Modena et al. 2002). Incluso, guías como la realizada en el 2013 por la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología (ESH/ESC, *siglas en inglés*) alegan como la DE predice el resultado clínico en pacientes con distintas ECV (Guiseppe Mancia et al. 2013).

Por todo esto, terapias basadas en el consumo de cantidades adecuadas de estos polifenoles podrían ayudar a mejorar la situación de marcadores tempranos de la Aterosclerosis, como la DE y la preHTA, contribuyendo así a disminuir la progresión y las complicaciones de dicha enfermedad (Lewington et al. 2002; Gutiérrez et al. 2013; Bonetti et al. 2003; Kinlay et al. 2001; Ribeiro et al. 2009; Ras et al. 2013; Xu et al. 2014; Shechter et al. 2009; Shechter et al. 2014; Corrado et al. 2008).

5.9. CARACTERÍSTICAS DEL ESTADO OXIDATIVO DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV

El Estrés Oxidativo (EO) se presenta cuando la producción de las especies reactivas, principalmente de oxígeno (EROs), no puede ser paliada por la capacidad antioxidante del organismo, produciéndose un desequilibrio a favor de las moléculas prooxidantes en detrimento de las defensas antioxidantes (Montuschi et al. 2007). Este desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, puede conducir a daños celulares provocados por la alteración de diversas biomoléculas (Sies 1991).

Respecto a las especies reactivas, existen diversos tipos como las EROs, las cuales son las especies reactivas más comúnmente implicadas en el EO y caracterizan la cuantificación del mismo. Sin embargo, también hay otras especies reactivas como las de nitrógeno (ERNs), las de cloro (ERCs), etc. (Strobel et al. 2011). Todas estas especies reactivas se producen a través de acciones enzimáticas o de otras interacciones químicas (Strobel et al. 2011). Además, suelen estar presentes en concentraciones bajas durante procesos fisiológicos, y en concentraciones elevadas en procesos patológicos (Montuschi et al. 2007; Dianzani 1992). En este sentido, la producción de especies reactivas sin sobrepasar ciertos límites es esencial para llevar a cabo procesos básicos como la regulación metabólica, la producción

de energía, la activación o inactivación de biomoléculas, la transducción de señales, el recambio celular o el control del tono vascular, entre otros (Dianzani 1992).

Dentro de las especies reactivas hay radicales libres (RL), los cuales son moléculas o fragmentos de éstas que contienen uno o más electrones desapareados en un orbital externo (Pryor 1986). Esta configuración espacial les otorga de una alta inestabilidad que les hace ser extraordinariamente reactivos. Además, los RL tienen una enorme capacidad para combinarse, inespecíficamente en la mayoría de los casos, con una gran variedad de moléculas (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). En condiciones normales de equilibrio oxidativo los RL no causan daño celular. Sin embargo, cuando se produce un aumento por encima de la capacidad antioxidante del organismo, estos RL alteran biomoléculas pudiendo ocasionar así daños en las células (Sies 1991; Freeman & Crapo 1982).

El EO juega un papel muy importante en el desarrollo de diversas patologías (Montuschi et al. 2007), entre las que se encuentran las ECV (Stocker & Keaney 2004; Paravicini & Touyz 2008; Elahi et al. 2009). Asimismo, cabe destacar que el EO es un estado fisiopatológico clave para el desarrollo, progresión y complicación de la Aterosclerosis (Dinh et al. 2016; Di Minno et al. 2016; Trpkovic et al. 2015; Strobel et al. 2011; Victor et al. 2009; Bonomini et al. 2008; Thomson et al. 2007; Stocker & Keaney 2004).

En este sentido, una pieza esencial en el proceso aterogénico es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (cLDLox) (Trpkovic et al. 2015). Incluso se le ha dado tanta importancia a su participación en dicho proceso, que se ha creado alrededor suyo una de las principales hipótesis que explican el complejo proceso de la Aterosclerosis (Steinberg et al. 1989; Stocker & Keaney 2004).

Las cLDLox tienen un papel clave tanto en el desarrollo de la placa aterosclerótica (H. Chen et al. 2008; Holvoet et al. 2007) como en su progresión (Huang et al. 2012; Koenig et al. 2011; Tushima et al. 2000) y desestabilización (Sigala et al. 2010; Uno, Kitazato, et al. 2005; Tsutsui et al. 2002; Nishi et al. 2002; Ehara et al. 2001; Yamashita et al. 2007). Este vínculo con la Aterosclerosis se debe a que las cLDLox poseen diversas acciones proinflamatorias, prooxidantes, proliferativas, proapoptóticas, protrombóticas, antifibrinolíticas y vasoconstrictoras a nivel vascular, las cuales explican su poder proaterogénico global y su gran importancia en todo el proceso aterosclerótico (Cahill & Redmond 2016; Le 2014; Maiolino et al. 2013; Pirillo et al. 2013; Xu et al. 2013; Ma et al. 2006).

Estas acciones provocan la promoción de la DE (Trpkovic et al. 2015; Gradinaru et al. 2015; Zhai et al. 2015; Cao et al. 2013; Plant et al. 2008; Li & Mehta 2003; Penn & Chisolm 1994; Pirillo et al. 2013), y la promoción y amplificación de la respuesta inflamatoria y oxidativa a nivel vascular (Cahill & Redmond 2016; Maiolino et al. 2013; Quinn et al. 1987; Rosenfeld et al. 1990; Quinn et al. 1988). Además de favorecer la formación del núcleo necrótico de la placa aterosclerótica (Valente et al. 2014; Maiolino et al. 2013; Loidl et al. 2004; Norata et al. 2002; Sata & Walsh 1998; Hardwick et al. 1996; Schwartz et al. 1991; Cathcart et al. 1985) y la remodelación de la pared del vaso sanguíneo (Cahill & Redmond 2016; Maiolino et al. 2013; Lindner et al. 1991; Kohno et al. 1998; Stiko-Rahm et al. 1992; Xu et al. 1999; Rajavashisth et al. 1998; Jimi et al. 1995), con la consecuente creación de placas de ateroma vulnerables a la ruptura (Stone et al. 2011; Virmani et al. 2000).

Así, los niveles circulantes de cLDLox elevados se encuentran asociados con todas las etapas de la Aterosclerosis, desde la aterogénesis temprana, HTA, enfermedad arterial coronaria y periférica, hasta los síndromes coronarios agudos e infartos cerebrales isquémicos (Trpkovic et al. 2015). En consecuencia, su medición resulta de gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la Aterosclerosis (Trpkovic et al. 2015; Itabe 2003; Huang et al. 2012; Ehara et al. 2001; Tsutsui et al. 2002; Meisinger et al. 2005). Respecto a este tema, cabe destacar como algunos autores han observado que su valoración muestra una mayor sensibilidad y especificidad que FRCV tradicionales para detectar a los sujetos con enfermedad arterial (Holvoet et al. 2001).

Por todo esto, los niveles circulantes elevados de cLDLox son considerados un predictor de ECV aterosclerótica (Trpkovic et al. 2015; Huang et al. 2012; Holvoet et al. 2001; Suzuki et al. 2002; Faviou et al. 2005; Huang et al. 2008; Wallenfeldt et al. 2004) y de futuros eventos CV (Salonen et al. 1992; Bayés et al. 2006; Bayés et al. 2003; Holvoet et al. 2004; Meisinger et al. 2005; Naruko 2006; Puurunen et al. 1994; Shimada et al. 2004; Shoji et al. 2002; Wallenfeldt et al. 2004), incluso en sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos (Meisinger et al. 2005; Holvoet et al. 2004; Holvoet et al. 2003). En estos últimos es de gran utilidad puesto que los niveles circulantes de cLDLox están asociados con la fase silenciosa de la progresión de la placa aterosclerótica de forma independiente a los FRCV tradicionales (Wallenfeldt et al. 2004; Hulthe & Fagerberg 2002; Metso et al. 2004).

La capacidad predictiva de los niveles circulantes de cLDLox de futuros eventos CV se ha observado en numerosos estudios (Kiechl et al. 2007; Shimada et al. 2004; Salonen et al. 1992; Bayés et al. 2006; Shoji et al. 2002; Tsutsui et al. 2002; Johnston et al. 2006b). Este es el caso del estudio realizado por Meisinger y colaboradores, donde se observó un fuerte

valor predictivo de los niveles circulantes de cLDLox para eventos coronarios agudos en hombres aparentemente sanos sin enfermedad cardíaca establecida. El valor predictivo se mantuvo después de ajustar el análisis por el hábito tabáquico, HTA, obesidad, actividad física, educación y consumo de alcohol. El hazard ratio (HR) para un evento coronario agudo en los sujetos que se situaban en el tercil más alto de los niveles circulantes de cLDLox fue de 4,25 (IC_{95%} 2,09-8,63; $p < 0.001$). En este estudio, los niveles circulantes de cLDLox resultaron ser el predictor más fuerte de eventos coronarios agudos en comparación con FRCV tradicionales (Meisinger et al. 2005).

En el estudio realizado por Shimada y colaboradores, también se pudo observar esta capacidad predictiva independiente de futuros eventos cardíacos de los niveles circulantes de cLDLox en sujetos con enfermedad coronaria arterial establecida. En este sentido, el riesgo observado fue 3,15 (IC_{95%} 1,47-6,76; $p = 0,003$) veces superior para los sujetos que se situaban en el cuartil más alto de los niveles circulantes de cLDLox (Shimada et al. 2004).

Por otra parte, en el estudio llevado a cabo por Wallenfeldt y colaboradores se observó cómo los niveles circulantes de cLDLox se asociaban con el número y el tamaño de las placas ateromatosas ($p = 0,008$), además de con el cambio en el grosor de la capa íntima-media de la arteria carotídea ($r = 0,17$; $p = 0,002$). Estas asociaciones permanecieron después de ajustar el análisis por los FRCV tradicionales ($p = 0,005$). Lo que indica que los niveles de cLDLox circulantes se asocian con la fase silenciosa de la progresión de la placa aterosclerótica en sujetos aparentemente sanos de forma independiente a los FRCV tradicionales (Wallenfeldt et al. 2004).

En el estudio de Tsimikas y colaboradores se obtuvo una fuerte asociación entre los niveles circulantes de cLDLox y la presencia, extensión y desarrollo de la Aterosclerosis carotídea y femoral. Además de predecir la presencia de ECV sintomática y mostrar una asociación con la severidad de la Aterosclerosis. De este modo, los niveles circulantes de cLDLox resultaron ser predictores de la presencia y extensión de la Aterosclerosis carotídea y femoral, del desarrollo de nuevas lesiones y del aumento del RCV (Tsimikas et al. 2006).

En el estudio realizado por Tsutsui y colaboradores en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (ICC), se observó cómo los niveles circulantes de cLDLox fueron significativamente mayores en sujetos con ICC grave en comparación con los niveles que presentaban los sujetos con ICC leve o sin ICC. Además, en este estudio se pudo ver que los niveles

circulantes de cLDLox eran un predictor independiente de mortalidad en sujetos con ICC (Tsutsui et al. 2002).

Asimismo, en el estudio llevado a cabo por Jorde y colaboradores en sujetos con enfermedad cardíaca crónica, se observó cómo un incremento de más de 11,0 U/L en los niveles de cLDLox se asociaba con un aumento del riesgo de mortalidad y con la necesidad de utilizar dispositivos de asistencia ventricular o trasplante de corazón durante un periodo de 19 años (HR=8,6; IC_{95%} 1,0-73,8; p=0,05). Este efecto fue significativo después de ajustar por el consumo máximo de oxígeno, la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, la clase de la Asociación del Corazón de Nueva York, el género y la edad (HR=46,6; IC_{95%} 1,5-144,1; p=0,02) (Jorde et al. 2007).

Por otro lado, en el estudio realizado por Johnston y colaboradores en sujetos con enfermedad coronaria inestable, se observó que los niveles circulantes de cLDLox ≥ 76 U/L se asociaban a una mayor recurrencia de infarto agudo de miocardio (IAM) (OR=1,90; IC_{95%} 1,05-3,39; p=0,032) comparado con aquellos sujetos que presentaban niveles de cLDLox < 76 U/L. Cuando el análisis se ajustó por otros conocidos predictores de IAM, los niveles circulantes de cLDLox predijeron de forma independiente el riesgo de IAM (OR=1,90; IC_{95%} 1,03-3,49). Asimismo, el valor pronóstico de los niveles de cLDLox fue mayor en los sujetos con troponina T (TnT) negativa ($< 0,01$ $\mu\text{g/L}$), siendo en estos sujetos la tasa de IAM del 16,9% en los sujetos con niveles circulantes de cLDLox ≥ 76 U/L comparado con una tasa del 1,7% en aquellos sujetos con niveles de cLDLox < 76 U/L (p=0,004). Por todo ello, los autores del estudio concluyeron que los niveles circulantes elevados de cLDLox pueden ayudar a identificar a los sujetos con enfermedad coronaria inestable con un mayor riesgo de sufrir IAM, de forma independiente a otros predictores de riesgo, especialmente en aquellos sujetos sin evidencia de daño miocárdico (Johnston et al. 2006b).

En el estudio de Kiechl y colaboradores se pudo ver cómo los sujetos situados en el tercil más alto para los niveles circulantes de cLDLox presentaban un mayor riesgo de sufrir eventos CV que los sujetos situados en el tercil más bajo (HR=2,4; IC_{95%} 1,3 a 4,3; p=0,004). Este resultado se obtuvo después de incluir en el análisis multivariado los FRCV tradicionales, la PCR-us y la actividad fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2, *siglas en inglés*). Además, los niveles de cLDLox predijeron futuros eventos CV más allá de la información proporcionada por el test de Framingham. En este sentido, dicho estudio concluyó que los niveles circulantes de cLDLox predicen las tasas de eventos CV a 10 años

de forma independiente de los FRCV tradicionales, de la PCR-us y del RCV obtenido en el test de Framingham (Kiechl et al. 2007).

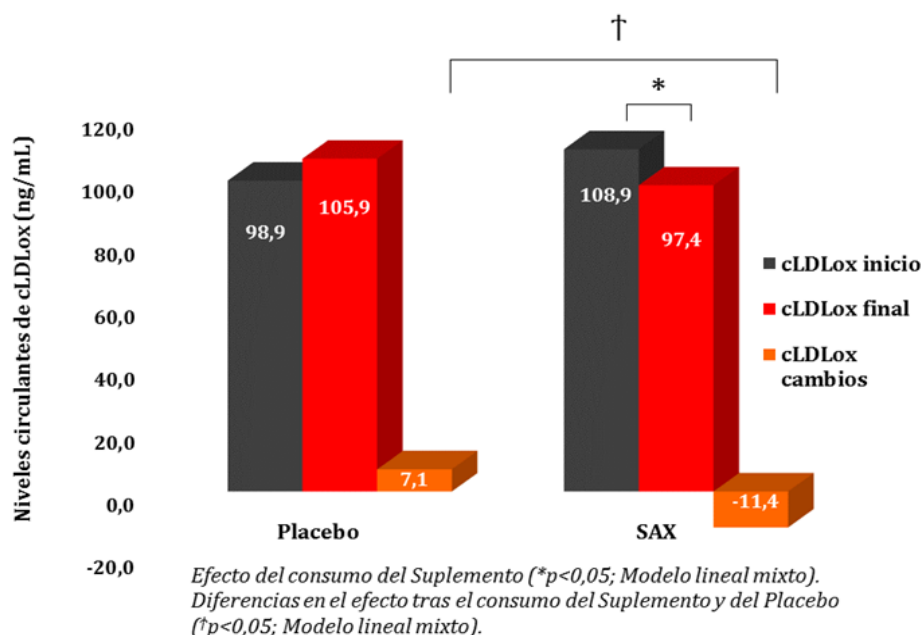
Por otra parte, varios estudios han observado que en sujetos que han sufrido infarto cerebral isquémico, pero no hemorragia cerebral, se presentan niveles elevados circulantes de cLDLox (Uno et al. 2003; Uno, Harada, et al. 2005). Sin embargo, estos niveles retornaban a los niveles basales de los sujetos después de aproximadamente 30 días del evento (Uno et al. 2003).

Por todo esto, diversos estudios sugieren que los niveles circulantes de cLDLox son un predictor independiente de Aterosclerosis subclínica en sujetos aparentemente sanos (Wallenfeldt et al. 2004; Hulthe & Fagerberg 2002; Metso et al. 2004), como los representados en esta tesis doctoral. Además de ser considerados como uno de los mejores biomarcadores para determinar cambios estructurales en las arterias en sujetos asintomáticos de ECV en comparación con otros marcadores de RCV (Kampus et al. 2007). Aunado a ello, los niveles circulantes de cLDLox son considerados como uno de los pocos biomarcadores de EO que son significativamente superiores en los sujetos con placas ateroscleróticas inestables en comparación con aquellos que presentaban placas estables (Sigala et al. 2010; Uno, Kitazato, et al. 2005). Encontrándose asociados con la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica (Nishi et al. 2002; Sigala et al. 2010; Uno, Kitazato, et al. 2005).

Además, en revisiones como la realizada por Trpkovic y colaboradores donde se ha evaluado el valor de los niveles circulantes de cLDLox como biomarcador y predictor de ECV, se ha observado una asociación de estos niveles con todas las etapas de la Aterosclerosis, desde la temprana aterogénesis, la HTA, la enfermedad arterial coronaria y periférica, hasta los diversos eventos CV (Trpkovic et al. 2015).

En este sentido, en el presente estudio se observó tras el consumo del Suplemento una reducción significativa de los niveles circulantes de cLDLox en la población total ($p < 0,05$). No observándose este efecto tras el periodo de intervención con Placebo. Cabe destacar en este aspecto, el descenso significativamente superior que se produjo en los niveles de cLDLox tras el periodo de intervención con el Suplemento comparado con Placebo (SAX: -11,44 vs. Placebo: 7,05 ng/mL; $p < 0,05$) (**Tabla 29; Gráfica 12**).

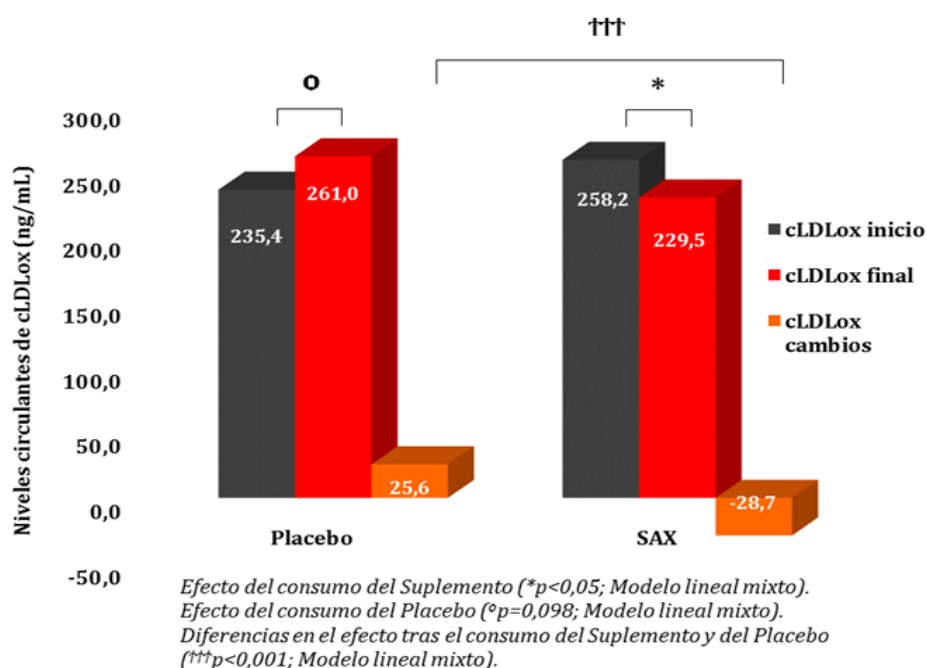
Gráfica 12. Inicio, fin y diferencias de los niveles circulantes de cLDLox en la población total en función del tratamiento.



Este descenso de los niveles circulantes de cLDLox tras el consumo del Suplemento fue especialmente acentuado en los sujetos que presentaban niveles circulantes elevados de cLDLox (de 258,2 [IC_{95%} 197,8-318,6] a 229,5 [IC_{95%} 164,1-294,9] ng/mL; $p < 0,05$). Por el contrario, tras el periodo de intervención con Placebo se produjo una tendencia al incremento (**Tabla 31**).

En este sentido, cabe resaltar el descenso significativamente superior de los niveles de cLDLox observado tras el consumo del Suplemento comparado con Placebo en estos sujetos con niveles elevados de cLDLox (SAX: -28,74 vs. Placebo: 25,64 ng/mL; $p < 0,001$) (**Tabla 31**; **Gráfica 13**).

Gráfica 13. Inicio, fin y diferencias de los niveles circulantes de cLDLox en los sujetos con elevados niveles circulantes de cLDLox en función del tratamiento.



Estas mejoras en los niveles circulantes de cLDLox se han observado en diversos estudios donde se ha evaluado el efecto del HT o de la PC o de alimentos ricos en estas biomoléculas (Mateos et al. 2016; Verhoeven et al. 2015; Marrugat et al. 2004; Covas et al. 2006). Este es el caso del ensayo clínico cruzado realizado por Marrugat y colaboradores en sujetos aparentemente sanos, donde se administraron 3 tipos de aceites de oliva diferentes (refinado, común y virgen) durante 3 semanas. El contenido fenólico del aceite de oliva virgen fue de 150 mg/kg (7% de HT). En este estudio se observó tras el consumo del aceite de oliva virgen una reducción significativa de los niveles circulantes de cLDLox (de $42,8 \pm 29,0$ a $28,3 \pm 20,1$ U/L; $p = 0,013$), lo cual fue acompañado de un incremento significativo de la excreción urinaria de HT ($p = 0,018$) (Marrugat et al. 2004).

En el estudio EUROLIVE, ensayo clínico cruzado y multicéntrico realizado en 5 países europeos en 200 sujetos aparentemente sanos, se administraron 25 mL/día de 3 tipos de aceites de oliva con diferente contenido fenólico (bajo contenido fenólico: 2,6 mg/kg, medio contenido fenólico: 164 mg/kg y alto contenido fenólico: 366 mg/kg) durante 3 semanas. Observándose tras el consumo de aceite de oliva con alto contenido fenólico la mayor reducción de los niveles circulantes de cLDLox ($-3,21$ [IC_{95%} -5,1- -0,8] U/L) (Covas et al. 2006). En el ensayo realizado por Verhoeven y colaboradores en 50 sujetos con síndrome metabólico, se observó tras la ingesta de un suplemento con extracto de oliva y de levadura

de arroz rojo (9,32 mg/cápsula de HT y 10,82 mg/cápsula de monacolínicas) durante 8 semanas, una disminución de los niveles circulantes de cLDLox del 20% vs. el 5% que se observó en el grupo placebo, habiendo diferencias significativas entre ambos ($p<0,001$) (Verhoeven et al. 2015). En el ensayo clínico cruzado realizado por Mateos y colaboradores, se obtuvo tras administrar durante dos días discontinuos 30 gramos de un alimento funcional rico en HT (5,25 mg), una disminución significativa de los niveles circulantes de cLDLox postprandiales comparado con placebo ($p=0,041$). Existiendo diferencias significativas en estos niveles tras el consumo del alimento rico en HT comparado con placebo a las 0,5 horas ($43,3\pm 10,7$ vs. $49,4\pm 12,1$ U/L, respectivamente; $p=0,028$) y a las 4 horas ($39,9\pm 9,7$ vs. $48,0\pm 13,0$ U/L, respectivamente; $p=0,015$) (Mateos et al. 2016).

Estos resultados, además de los obtenidos en el presente estudio, están en consonancia con las recomendaciones de la EFSA acerca del consumo diario de al menos 5 mg de HT, como medio de protección frente al daño oxidativo de las cLDL (EFSA 2011). Uno de los mecanismos propuestos por los cuales el HT reduce los niveles de cLDLox, es la modulación de la expresión de genes implicados en el proceso aterogénico (Castaner et al. 2012; Zrelli, Matsuoka, Kitazaki, Araki, et al. 2011).

Por otro lado, también se ha observado el papel protector frente a la oxidación de las cLDL de los compuestos bioactivos provenientes de la granada, entre los que destaca la PC (Vilahur et al. 2015; Aviram et al. 2008; Rosenblat et al. 2006; Aviram et al. 2004; Kaplan et al. 2001). Este efecto protector se muestra en diversos estudios, entre los que se encuentra el realizado por Aviram y colaboradores en sujetos con estenosis severa asintomática de la arteria carótida. En este estudio se observó que el consumo de zumo de granada con un contenido de PC de 1.561 mg/L, redujo significativamente ($p<0,01$) los niveles circulantes de cLDLox en un 24% después de 1 mes de consumo (de 2.070 ± 61 EU/mL a 1.563 ± 69 EU/mL). Asimismo, a los 6 meses de su consumo se obtuvo una reducción del 90% de los niveles de cLDL asociados a los peróxidos lipídicos (Aviram et al. 2004).

El estudio realizado por Rosenblat y colaboradores en sujetos diabéticos, también observó este efecto protector tras el consumo de 50 mL/día de zumo de granada durante 3 meses. Estos investigadores obtuvieron una disminución significativa (39%) de la captación celular por parte de los macrófagos de las cLDLox (Rosenblat et al. 2006).

Asimismo, en el estudio llevado a cabo por Aviram y colaboradores en ratones con lesiones ateroscleróticas, en el cual se administraron varios tipos de extractos de granada durante 3

meses, también se observó cómo las tasas de captación de las cLDLox por parte de los macrófagos peritoneales de estos ratones se redujeron significativamente (10%) tras la administración de extractos obtenidos de la cascara de la granada ricos en PC (Aviram et al. 2008).

Por otra parte, en el estudio realizado por Vilahur y colaboradores en cerdos alimentados con una dieta normocolesterólemica o hipercolesterolémica durante 10 días, se vio que, tras la suplementación con extracto de granada (200 mg/día de PC) en los cerdos con dieta hipercolesterolémica, existía un incremento significativo de la resistencia a la oxidación de las cLDL ($p < 0,05$) (Vilahur et al. 2015). Del mismo modo, el estudio llevado a cabo por Kaplan y colaboradores en ratones con Aterosclerosis avanzada, observó tras la administración de zumo de granada durante 8 semanas una reducción significativa del 31% de la captación de cLDLox por parte de los macrófagos peritoneales. Además de una reducción del 17% en las lesiones ateroscleróticas comparado con el grupo control (Kaplan et al. 2001).

La PC podría proporcionar este efecto protector frente a la oxidación de las cLDL a través de un efecto antioxidante directo sobre estas moléculas y a través de la reducción de la capacidad de los macrófagos para oxidar a las cLDL, entre otros mecanismos (Aviram et al. 2004; Rosenblat et al. 2006; Aviram et al. 2002).

Por otro lado y como se ha comentado con anterioridad, diversos estudios han observado una mejora simultánea de la función endotelial y de los niveles circulantes de cLDLox (Gradinaru et al. 2015; Valls et al. 2015; Moreno-Luna et al. 2012; Vilahur et al. 2015). Esto ha tenido como consecuencia que algunos autores sugieran una posible relación inversa entre la función endotelial y los niveles circulantes de cLDLox (Gradinaru et al. 2015; Valls et al. 2015). En este sentido, es importante señalar que esta relación se ha observado en el presente estudio en diversos subgrupos, como se ha analizado en apartados anteriores (**Gráficas 10 y 11**).

El vínculo existente entre la mejora del EO y de la función endotelial podría ser establecido mediante un incremento de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), cuantificado a través de sus metabolitos (Ruano et al. 2005). Esta mejora simultánea de los niveles circulantes de cLDLox y de la función endotelial se puede observar en estudios como el ensayo cruzado realizado por Valls y colaboradores, donde se administraron 2 tipos de aceites de oliva (FVOO con 961 mg/kg de contenido fenólico y VOO con 289 mg/kg) en sujetos con preHTA

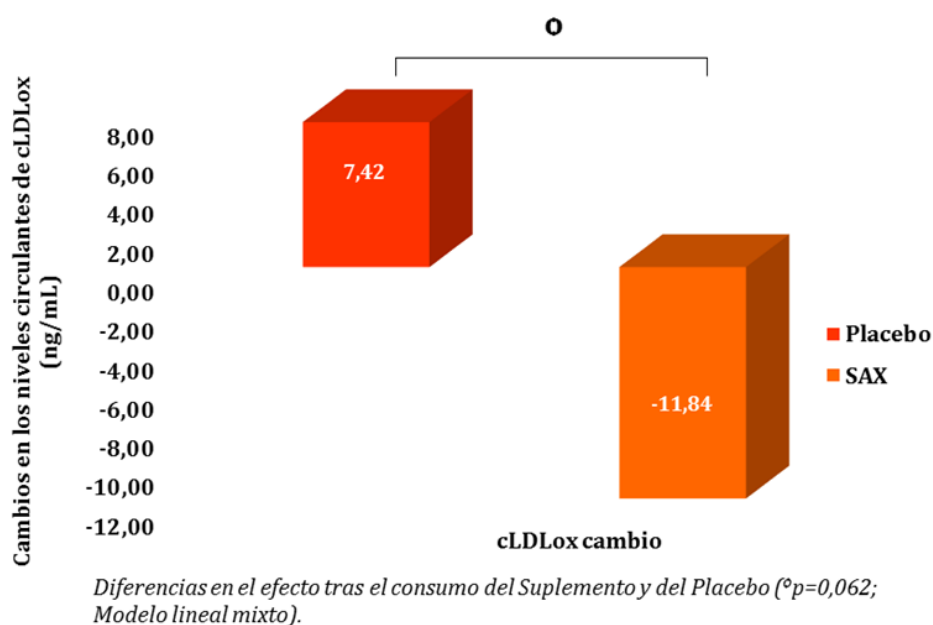
y HTA en estadio 1. En este estudio se obtuvo que, tras la ingesta de FVOO, existía un incremento significativo de la función endotelial en comparación con lo observado tras el consumo de VOO ($p<0.05$), además de una disminución de los niveles circulantes de cLDLox ($p=0,010$). Aunado a ello, estos investigadores pudieron constatar la existencia de una asociación inversa y significativa entre la función endotelial y los niveles circulantes de cLDLox ($p=0,01$) (Valls et al. 2015).

En otro estudio realizado en sujetos con preHTA o HTA en estadio 1, donde se administraron 2 tipos de aceites de oliva [uno rico en polifenoles (~ 30 mg/día) y el otro refinado sin contenido fenólico], se observó tras el consumo del aceite de oliva rico en polifenoles un incremento significativo de la función endotelial ($+345\pm 386$ unidades de perfusión/seg; $p<0,001$), a la par que disminuyó significativamente los niveles circulantes de cLDLox ($-28,2\pm 28,5$ $\mu\text{g/L}$; $p<0,01$) (Moreno-Luna et al. 2012).

También en el estudio de Vilahur y colaboradores realizado en cerdos con dieta normocolesterolémica o hipercolesterolémica a los que se les administró o no un suplemento con PC (200 mg/día), se observó tras el consumo del suplemento un efecto protector conjunto frente al daño endotelial y a la oxidación de las cLDL en los cerdos con riesgo (Vilahur et al. 2015).

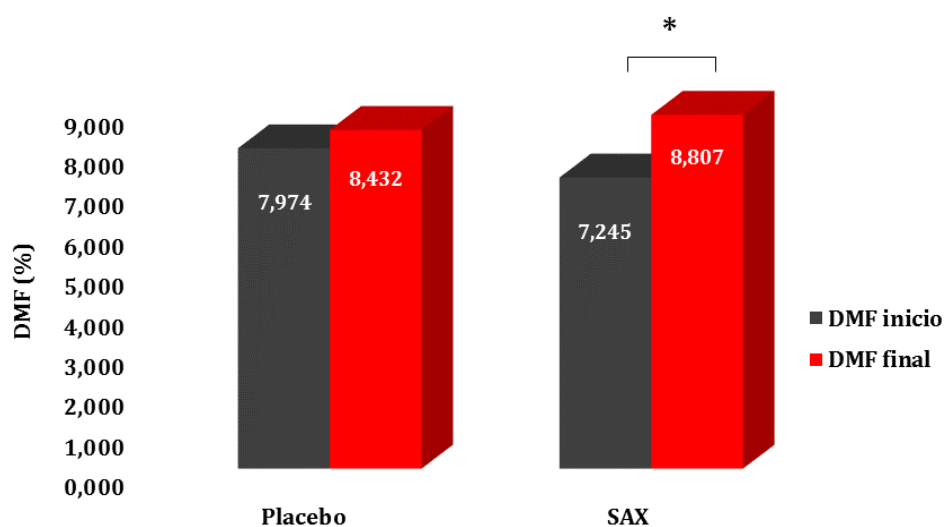
A este respecto y en consonancia con los resultados expuestos, en el presente estudio se ha observado una mejora simultánea de los niveles circulantes de cLDLox ($p<0,05$) (**Tabla 29**) y de la función endotelial ($p<0,05$) (**Tabla 26**) en la población total tras el consumo del Suplemento (SAX). Además, en los sujetos con disfunción endotelial (DE) se produjo una mejora en los niveles de cLDLox tras el consumo del Suplemento, observándose un descenso superior comparado con Placebo (SAX: $-11,84$ vs. Placebo: $7,42$ ng/mL; $p=0,062$) (**Tabla 30; Gráfica 14**).

Gráfica 14. Diferencias en los niveles circulantes de cLDLox en los sujetos con DE entre las diversas intervenciones.



Asimismo, en los sujetos con niveles de cLDLox $\leq 131,9$ ng/mL se obtuvo tras el consumo del Suplemento una mejora significativa de la función endotelial (de 7,245 [IC_{95%} 6,412-8,077] a 8,807 [IC_{95%} 7,929-9,685] %; $p < 0,05$) (**Tabla 28; Gráfica 15**). Este incremento de la función endotelial también se pudo ver en los sujetos con niveles circulantes elevados de cLDLox ($> 131,9$ ng/mL) tras el periodo de intervención con el Suplemento, los cuales mejoraron simultáneamente los niveles de cLDLox (**Tabla 31**) y la función endotelial (**Tabla 28**). Llegando incluso a recuperar una función endotelial normal (DMF $\geq 10\%$), aunque dicho cambio no fue significativo (de 9,576 [IC_{95%} 6,789-12,36] a 10,51 [IC_{95%} 7,912-13,10] %) (**Tabla 28**).

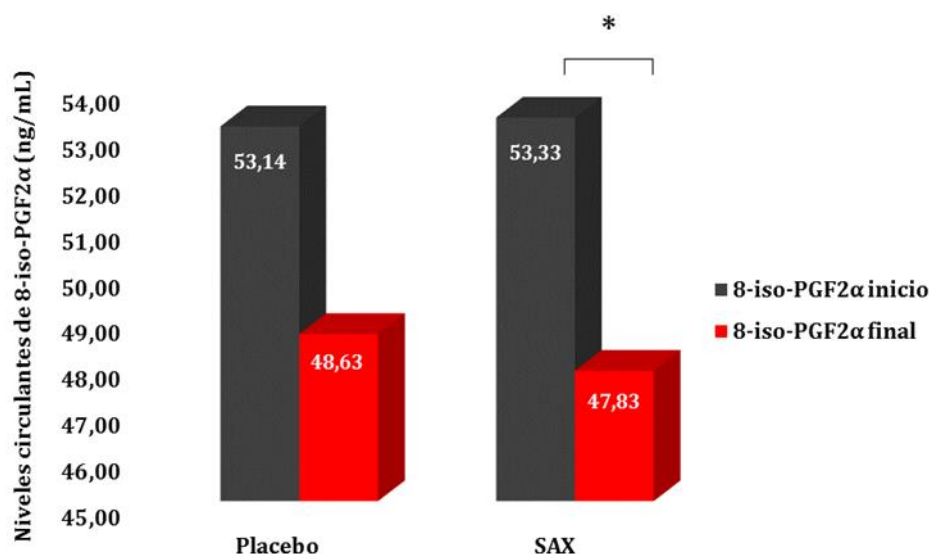
Gráfica 15. . Inicio y fin de la función endotelial en los sujetos con niveles circulantes normales de cLDLox en función del tratamiento.



Efecto del consumo del Suplemento ($p < 0,05$; Modelo lineal mixto).*

Por otra parte, en el presente estudio también se observaron cambios en otras variables del estado oxidativo. En este sentido, cabe destacar la reducción significativa de los niveles circulantes de 8-iso-PGF_{2α} tras el consumo del Suplemento en los sujetos con preHTA sistólica o HTA (de 53,33 [IC_{95%} 48,55-58,11] a 47,83 [IC_{95%} 43,17-52,49] ng/mL; $p = 0,021$) (Tabla 35; Gráfica 16).

Gráfica 16. Inicio y fin de los niveles circulantes de 8-iso-PGF_{2α} en los sujetos con preHTA sistólica o HTA en función del tratamiento.



*Efecto del consumo del Suplemento (*p<0,05; Modelo lineal mixto).*

Asimismo, se produjo una tendencia al descenso en los niveles circulantes de 8-iso-PGF_{2α} tras el consumo del Suplemento en los sujetos con preHTA diastólica o HTA (de 53,50 [IC_{95%} 48,16-58,83] a 47,61 [IC_{95%} 41,98-53,24] ng/mL; p=0,058) (**Tabla 36**) y en los sujetos con niveles circulantes elevados de cLDLox (de 56,62 [IC_{95%} 48,13-65,11] a 46,48 [IC_{95%} 37,50-55,45] ng/mL; p=0,080) (**Tabla 31**).

En este sentido, es importante mencionar la relevancia de los resultados obtenidos al haberse observado en revisiones como la realizada por Petrosino y colaboradores, cómo solo un porcentaje inferior al 45% de las intervenciones con antioxidantes, ya sea a través de dietas, alimentos o suplementos, ha observado disminuciones en los niveles circulantes de isoprostanos (Petrosino & Serafini 2014).

Respecto a los niveles circulantes de FRAP, en el presente estudio se produjo un aumento significativo tras el periodo de intervención con Placebo (de 0,422 [IC_{95%} 0,404-0,439] a 0,433 [IC_{95%} 0,415-0,450] μMeq.T; p<0,05), sin diferencias significativas entre los periodos de intervención (**Tabla 29**). Esto podría deberse a un aumento compensatorio de la síntesis endógena de antioxidantes tales como el ácido úrico, el cual posee una importante capacidad de reducción férrica y mantiene una correlación directa con los niveles circulantes de FRAP (r=0,819) (Fernández-Pachón et al. 2005). En este sentido, los niveles

de ácido úrico pueden llegar a representar hasta un 60% de los niveles circulantes de FRAP (Yeum et al. 2004). Asimismo, el HT es un compuesto fenólico muy sensible a los cambios de pH y a la presencia de iones (Paiva-Martins et al. 2006; Paiva-Martins & Gordon 2005), entre los que se encuentra los iones férricos presentes en esta prueba. Esta situación podría haber disminuido considerablemente su potencial reductor y haber afectado a los resultados obtenidos a través de la medición de FRAP (Paiva-Martins & Gordon 2005).

En lo referente a los niveles circulantes de nitratos y nitritos [NO(x)], metabolitos del NO y relacionados con su biodisponibilidad, en el presente estudio se observó un incremento tras el consumo del Suplemento en los sujetos con valores normales de PAS. A este respecto, cabe destacar la existencia de diferencias significativas entre ambos periodos de intervención al finalizar el estudio (SAX: 2,89 vs. Placebo: -2,42 μ M; $p < 0,05$). Asimismo, se produjo en estos sujetos una mejora simultánea de los niveles de NO(x), de la función endotelial (SAX: 1,82 vs. Placebo: 0,30 %; $p < 0,05$) y de los niveles de cLDLox (SAX: -10,41 vs. Placebo: 14,20 ng/mL; $p < 0,05$) tras el periodo de intervención con el Suplemento (**Tabla 35**).

La mejora de los niveles de NO(x) también se observó en los sujetos con valores normales de PAD tras el consumo del Suplemento. Existiendo diferencias significativas entre ambos periodos de intervención al final del estudio (SAX: 3,17 vs. Placebo: -3,08 μ M; $p < 0,05$). En estos sujetos también se produjo una mejora conjunta de los niveles de NO(x), de la función endotelial (SAX: 1,89 vs. Placebo: 0,21 %; $p < 0,05$) y de los niveles de cLDLox (SAX: -13,25 vs. Placebo: 10,19 ng/mL; $p < 0,05$) tras el periodo de intervención con el Suplemento (**Tabla 36**).

Asimismo, se observó una tendencia al aumento en los niveles de NO(x) en los sujetos con niveles circulantes de cLDLox $\leq 131,9$ ng/mL tras el periodo de intervención con el Suplemento superior comparado con Placebo (SAX: 1,47 vs. Placebo: -1,92 μ M; $p = 0,084$) (**Tabla 31**). La cual fue igualmente acompañada por una mejora en la función endotelial ($p < 0,05$) tras dicha intervención (**Tabla 28; Gráfica 15**).

En este sentido es ampliamente conocido el vínculo existente entre el NO, la función endotelial y el EO. A tenor del cual, diversos estudios sugieren la existencia de una

protección frente al daño endotelial producido por una mejora en el funcionamiento de la enzima eNOS y en la biodisponibilidad del NO, cuantificado a través de sus metabolitos (Vilahur et al. 2015; Storniolo et al. 2014; Zrelli et al. 2013; Heiss et al. 2005). Esta mejora en la biodisponibilidad del NO es en gran medida promovida por un descenso en el EO (Suganya et al. 2016; Yetik-Anacak & Catravas 2006). Además, dicha relación también se produce en sentido inverso ya que el NO previene la presencia de EO a nivel vascular, evitando la oxidación de las cLDL, entre otros efectos (Cahill & Redmond 2016; Montezano & Touyz 2012; Davignon & Ganz 2004; Egashira 2002; Britten et al. 1999).

En otras variables evaluadoras del estado oxidativo, como son los niveles circulantes de TBARS y PON-1, no se observaron cambios significativos a lo largo del estudio en ninguno de los grupos evaluados (**Tablas 29, 30 y 31**). En el caso de los niveles de PON-1, podría deberse a que solo se ha observado estar disminuida en los sujetos con diabetes instaurada (Tsuzura et al. 2004) o HTA (Uzun et al. 2004). En este sentido, en el presente estudio no existieron sujetos con diabetes y solo un 4,5% de los sujetos presentaba HTA.

En conclusión, en el presente estudio se observó un descenso significativo de los niveles circulantes de cLDLox tras el consumo del suplemento, especialmente en los sujetos que presentaban niveles circulantes elevados de cLDLox. Asimismo, tras el periodo de intervención con el suplemento se obtuvieron mejoras en los niveles circulantes de 8-iso-PGF_{2α} y de NO(x) en diversos grupos evaluados.

5.10. CARACTERÍSTICAS DEL ESTADO INFLAMATORIO DE LA POBLACIÓN EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO (TX) Y DEL TX Y DIVERSOS FRCV

El estado proinflamatorio es otro proceso fisiopatológico clave en el desarrollo y progresión de la Aterosclerosis (Libby et al. 2010; Libby 2012; Tousoulis et al. 2003). En este sentido, uno de los principales mecanismos de defensa del vaso sanguíneo contra la inflamación descontrolada en la zona, es la capacidad del endotelio sano para regular la adhesión y trans migración de las células inflamatorias a la íntima arterial (Montezano & Touyz 2012; Davignon & Ganz 2004; Badimón & Martínez-González 2002). Si esta capacidad se pierde por la lesión del endotelio y la consecuente aparición de la disfunción endotelial (DE), se produce, entre otros eventos, la presencia de moléculas de adhesión en las células endoteliales (CEs) del vaso sanguíneo. Entre estas moléculas de adhesión se encuentran la

molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, *siglas en inglés*) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, *siglas en inglés*).

Las moléculas de adhesión juegan un papel fundamental en la interacción entre el endotelio vascular y los leucocitos, debido a que fijan y ayudan a la trans migración de los leucocitos al interior de la pared del vaso sanguíneo (Nakashima et al. 1998). Además en la zona lesionada, se estimula la síntesis de factores quimiotácticos que favorecen la migración de las células inflamatorias al espacio subendotelial (Libby et al. 2010).

La expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio es estimulada por la presencia de citoquinas proinflamatorias a nivel vascular, tales como la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , *siglas en inglés*) y la proteína C reactiva de fase aguda (PCR). La PCR juega un importante papel en la regulación de la intensidad y extensión de la reacción inflamatoria aguda. Asimismo, es producida en el hígado en respuesta a la presencia de interleucina 6 (IL-6) a nivel sistémico (Verma et al. 2002; Collins & Cybulsky 2001). Además, la PCR secretada interactúa con las CE y estimula la producción de la IL-6, creando un círculo proinflamatorio. Por otra parte, la IL-6 es una citoquina proinflamatoria que al unirse a su receptor soluble (sIL-6R, *siglas en inglés*) forma el complejo IL-6/sIL-6R, el cual estimula el reclutamiento de leucocitos a nivel vascular y promueve la respuesta inflamatoria de las CE.

Las moléculas de adhesión, como se ha comentado anteriormente, favorecen la fijación de diversos leucocitos a la pared arterial, entre los que se encuentran los monocitos. Una vez fijados los monocitos al endotelio, lo atraviesan y se dirigen hacia la íntima arterial. En la capa íntima es estimulada la proliferación de los monocitos y su diferenciación a macrófagos por diversos estímulos, entre los que hallan el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF, *siglas en inglés*) (Hamilton et al. 1999; Kamanna et al. 1999; Kaplan & Aviram 1999) y las cLDLox (Cahill & Redmond 2016; Maiolino et al. 2013; Yui et al. 1993).

Cuando los monocitos han madurado a macrófagos en la íntima, expresan receptores *scavenger* que les permiten unirse a las cLDLox y “engullirlas”. La acumulación excesiva de estas lipoproteínas modificadas en el citoplasma de los macrófagos, promueve que se conviertan en células espumosas características de las lesiones ateroscleróticas. Si el estímulo lesivo o la DE continúan, los macrófagos seguirán proliferando dentro de la íntima y se mantendrá y amplificará la respuesta inflamatoria. Esto favorecerá la acumulación dentro de la pared arterial de otras células inmunitarias, entre las que se encuentran los

linfocitos T (Libby 2002) que amplificaran aún más esta respuesta (Yokota & Hansson 1995).

Todas estas células del sistema inmune activadas en la lesión arterial producen diversas citoquinas, como citoquinas proinflamatorias [interferón γ (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1), TNF α , etc.] que inducen la producción de cantidades sustanciales de IL-6. La IL-6 estimula a su vez la producción de grandes cantidades de reactantes de fase aguda, entre los que se encuentran la PCR y el fibrinógeno (Hansson 2005).

Las células del sistema inmune a nivel vascular intentan, a través de la remodelación tisular, recuperar la estructura y funcionalidad características del vaso sanguíneo. Sin embargo, esta remodelación puede descompensarse por una excesiva proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLVs) y un exceso en la producción de la matriz extracelular, lo que incrementa el crecimiento de la placa aterosclerótica y amplifica la lesión vascular (Hartman & Frishman 2014). Esta situación puede provocar la aparición de estenosis en la luz vascular.

En fases avanzadas, el estímulo inflamatorio induce apoptosis de las CMLVs, así como la secreción de enzimas hidrolíticas (colagenasas, gelatinasas, elastasas, etc.) que remodelan la matriz extracelular. Estos eventos favorecen la creación de placas ateroscleróticas vulnerables (Libby et al. 1996; Libby 1995).

La estabilidad de la placa de ateroma depende, entre otros factores, del aumento de la actividad de las enzimas hidrolíticas producidas por los macrófagos que degradan la matriz extracelular, de la inhibición de la producción de colágeno por parte de las CMLVs y de la promoción de la apoptosis de las diversas células que la constituyen. Esto es debido a que dichos acontecimientos debilitan la cápsula fibrosa de la placa, haciéndola más frágil y propensa a su ruptura, de manera que cualquier fuerza mecánica puede fragmentarla (Libby et al. 1996; Libby 1995).

Si se produce la ruptura de la placa de ateroma, el contacto de la sangre con el núcleo necrótico de la placa, rico en factor tisular y muy trombogénico, pone en marcha el mecanismo de la coagulación y la formación de un trombo, responsable en última instancia, de la oclusión vascular (Hansson 2005; Páramo et al. 2003). Este hecho puede desencadenar en un evento CV, entre los que se encuentran el infarto de miocardio (IAM) y el accidente cerebrovascular (ACV) (Moore & Tabas 2011).

En investigación se han utilizado, desde hace décadas, la medición de los niveles circulantes de diversas citoquinas (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, etc.) para evaluar el grado de inflamación existente en los sujetos. Otras moléculas utilizadas como biomarcadores inflamatorios son la PCR y el fibrinógeno.

La PCR es una proteína de fase aguda inespecífica, cuyos niveles elevados pueden tener efectos directos sobre las células vasculares al estimular la producción de citoquinas proinflamatorias y de factores protrombóticos (Amezcu-Guerra et al. 2007). La asociación entre las concentraciones séricas de PCR y el RCV ha sido sugerida por varios estudios (Kazemi-Bajestani et al. 2015; Zakynthinos & Pappa 2009). Sin embargo, en diversos metaanálisis y revisiones se ha observado que su poder predictor para eventos CV es moderado (He et al. 2010; Danesh et al. 2004; Shah et al. 2009).

En este sentido, revisiones como la realizada por Shah y colaboradores concluyen que los niveles séricos de PCR no funcionan mejor como predictor del RCV que la ecuación de riesgo de Framingham para la discriminación del riesgo de los sujetos. Además, la mejora ocasionada en la reclasificación del RCV al añadir los niveles de PCR a modelos basados en los FRCV tradicionales, ha sido pequeña e inconsistente (Shah et al. 2009).

En el metaanálisis de Danesh y colaboradores, se observó que los niveles séricos de PCR actuaban como un predictor relativamente moderado de enfermedad coronaria. Estos autores concluyeron que es necesario revisar las recomendaciones realizadas sobre su uso en la predicción de la enfermedad coronaria (Danesh et al. 2004).

Estas conclusiones están en consonancia con lo observado en el metaanálisis realizado por Buckley y colaboradores, donde los autores determinaron que la evidencia que vincula los cambios en los niveles séricos de PCR a la prevención primaria de eventos de cardiopatía coronaria es limitada. Además, estos autores concluyeron que hay una evidencia moderada en lo que respecta a la mejora que supone añadir los niveles de PCR a la clasificación del RCV en personas de riesgo intermedio. Sin embargo, comentan que existe evidencia suficiente en lo que se refiere al descenso que se produce en el riesgo de sufrir eventos de cardiopatía isquémica en sujetos de riesgo intermedio, al reducir los niveles séricos de PCR (Buckley et al. 2009).

En este aspecto, entidades como la *Emerging Risk Factors Collaboration* determinan en su metaanálisis que el poder predictor de eventos CV de los niveles séricos de la PCR sigue siendo aún poco claro. Además, exponen que la asociación de la PCR con la patología isquémica vascular es considerablemente dependiente de FRCV tradicionales y de otros marcadores inflamatorios, como el fibrinógeno (Emerging Risk Factors Collaboration et al. 2010).

En estudios como el realizado recientemente por Jiménez y colaboradores en mujeres aparentemente sanas, solo se observó una asociación significativa con el ictus cuándo los sujetos se ubicaban en el cuartil más alto para los niveles de PCR-us ($>14,4$ mg/L) (HR=1,77; IC_{95%} 1,39-2,26; $p<0,001$). Esta asociación disminuía tras ajustar el análisis por los FRCV tradicionales (HR=1,49; IC_{95%} 1,14-1,94; $p=0,002$). El riesgo para el primer cuartil (PCR-us: <1 mg/L) fue de 1,00; para el segundo cuartil (PCR-us: 1-3 mg/L) fue de 1,13 [IC_{95%} 0,87-1,46] y para el tercer cuartil (PCR-us: >3 - $<14,4$ mg/L) fue de 1,20 [IC_{95%} 0,92-1,55]. En este estudio no hubo asociación significativa entre los niveles séricos de PCR-us y los eventos cerebrovasculares en las mujeres con HTA (HR=1,21; IC_{95%} 0,81-1,82; $p=0,08$), pero sí presentaron esta asociación las mujeres con preHTA (HR=1,90; IC_{95%} 1,18-3,08; $p=0,03$). Esto posiblemente se deba a que no se ajustó el modelo por la medicación antihipertensiva que pudieran tomar las mujeres con HTA, contrariamente a lo que realizó el mismo autor en el estudio anterior que llevó a cabo en hombres (Jiménez et al. 2016). En este estudio realizado por el mismo autor en hombres aparentemente sanos, se evaluó el poder predictivo de los niveles séricos de PCR-us para el ictus. En este aspecto, se observó, después de ajustar por factores de confusión para el ictus entre los que se encontraba la toma de medicación antihipertensiva, que los hombres que presentaban cifras superiores a 3 mg/L tenían un 40% más de riesgo de sufrir un ictus cerebral que los que presentaban niveles de PCR <1 mg/L (HR=1,40; IC_{95%} 1,06-1,87; $p=0,02$). El riesgo global de los hombres con preHTA fue de 1,36 [IC_{95%} 0,76-2,42] ($p=0,30$) y con HTA de 1,42 [IC_{95%} 1,01-1,99] ($p=0,05$) (Jiménez et al. 2015).

Aún en la actualidad, siguen existiendo discrepancias en lo referente al valor predictivo de los niveles séricos de PCR en la morbimortalidad CV. Estas discrepancias pueden ser debidas a la falta de especificidad de la PCR y a la dependencia que mantiene con FRCV tradicionales y otros biomarcadores inflamatorios (Krintus et al. 2014).

En el presente estudio, la media basal de la población en los niveles séricos de PCR-us estuvo dentro de los rangos de normalidad en ambos periodos de intervención

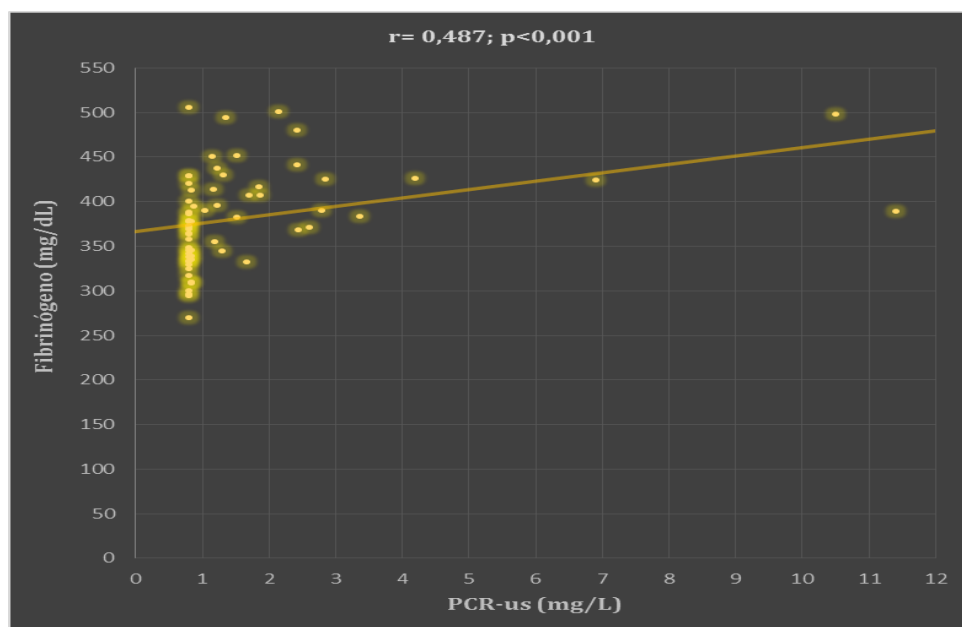
(Placebo/SAX: 1,23 [IC_{95%} 0,98-1,47] & SAX/Placebo: 2,02 [IC_{95%} 1,09-2,95] mg/L) (**Tabla 5**). Estos niveles séricos de PCR-us tendieron a aumentar tras el periodo de intervención con Placebo (de 1,56 [IC_{95%} 1,13-1,99] a 1,97 [IC_{95%} 1,44-2,51] mg/L; $p=0,065$) (**Tabla 32**). Observándose un incremento constante, aunque no significativo, tras este periodo en todos los grupos evaluados (**Tablas 32-34**). Este aumento se produjo especialmente en aquellos sujetos que presentaron, al inicio del estudio, cifras de PCR-us entre 1 y 3 mg/L (32,8%) ($p=0,079$), los cuales mostraban un RCV moderado según la *American Heart Association* (AHA) (Pearson et al. 2003).

La tendencia al aumento de los niveles de PCR-us tras el periodo de intervención con Placebo, también se observó en los sujetos con niveles circulantes elevados de cLDLx ($p=0,089$) (**Tabla 34**). Por el contrario, tras el consumo del Suplemento se produjo una disminución de los niveles de PCR-us en la mayoría de los grupos evaluados, si bien ésta reducción no fue significativa (**Tablas 32-34**).

El fibrinógeno es una proteína de fase aguda que desempeña un papel importante en la cascada de la coagulación de la sangre. El fibrinógeno es el precursor de la fibrina y el responsable de la formación de los coágulos sanguíneos, los cuales controlan la pérdida de sangre en los sitios donde se ha producido daño tisular. Además, varios de sus productos de escisión tienen propiedades reguladoras de la adhesión celular y de la diseminación, acciones vasoconstrictoras y quimiotácticas, y son mitógenos para varios tipos de células, entre las que se incluyen los fibroblastos, las CE y las CMLVs (Herrick et al. 1999). Los niveles séricos elevados de fibrinógeno han mostrado estar asociados con las ECV y con los eventos CV (Emerging Risk Factors Collaboration et al. 2012; Fibrinogen Studies Collaboration et al. 2005), con la Aterosclerosis subclínica (Green et al. 2009) y con diversos FRCV (Kaptoge et al. 2007). Sin embargo, algunos estudios recientes, entre los que se encuentran metaanálisis genómicos, no apoyan la relación causal entre los niveles séricos elevados de fibrinógeno y un mayor RCV (Jiménez et al. 2016; Sabater-Lleal et al. 2013), de ECV (Sabater-Lleal et al. 2013), ni su relación con diversos FRCV (Baumert et al. 2014). Esto puede deberse a su posible relación de dependencia con otros biomarcadores inflamatorios, como los niveles séricos de PCR (Appiah et al. 2015).

A este respecto, en el presente estudio se observó una correlación directamente proporcional y significativa entre los niveles séricos de fibrinógeno y los niveles séricos de PCR-us ($r=0,487$; $p<0,001$) (**Gráfica 17**).

Gráfica 17. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y de PCR-us en la población total al inicio del estudio.



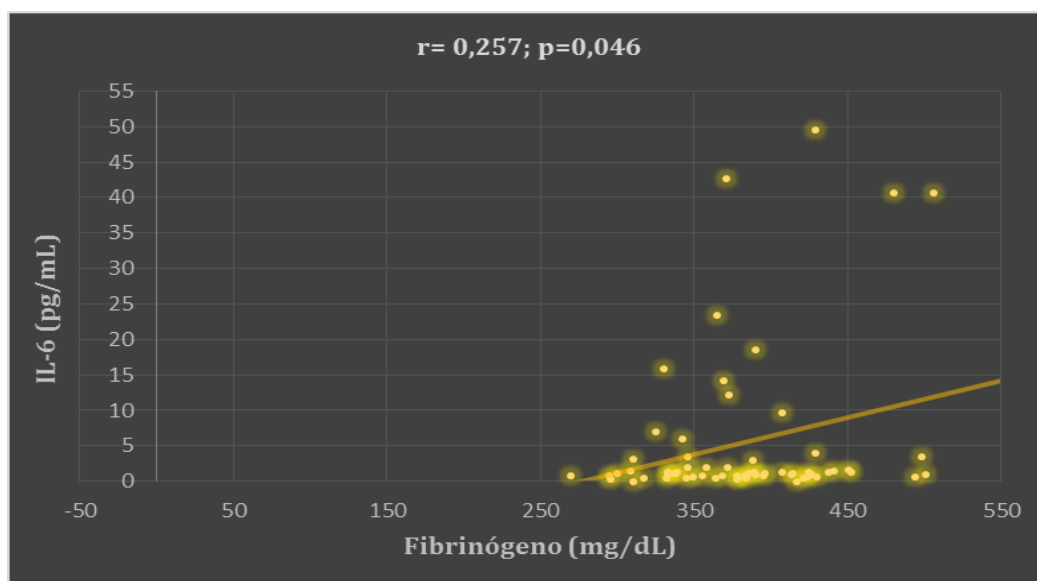
Asimismo, se observó en los sujetos que presentaban niveles de PCR-us superiores a 1 mg/L y niveles de fibrinógeno superiores a 400 mg/dL, una tendencia al descenso tras el consumo del Suplemento en los niveles séricos de fibrinógeno (de $435,1 \pm 29,3$ a $415,6 \pm 28,8$ mg/dL; $p=0,079$). Cabe mencionar que este comportamiento no se produjo tras el periodo de intervención con Placebo (de $442,9 \pm 27,0$ a $433,4 \pm 53,6$ mg/dL; $p=0,550$).

Por otra lado, aunque la media poblacional del estudio partió de niveles basales de fibrinógeno situados dentro de la normalidad ($381,2$ [IC_{95%} $362,1$ - $400,3$] mg/dL) (**Tabla 5**), se pudo observar tras el consumo del Suplemento una disminución de los niveles de fibrinógeno en la mayoría de los grupos evaluados, si bien esta reducción no fue significativa (**Tablas 32-34**). Esta situación fue contraria a la obtenida tras el periodo de intervención con Placebo, donde se observó un incremento de los niveles de fibrinógeno en todos los grupos analizados (**Tablas 32-34**).

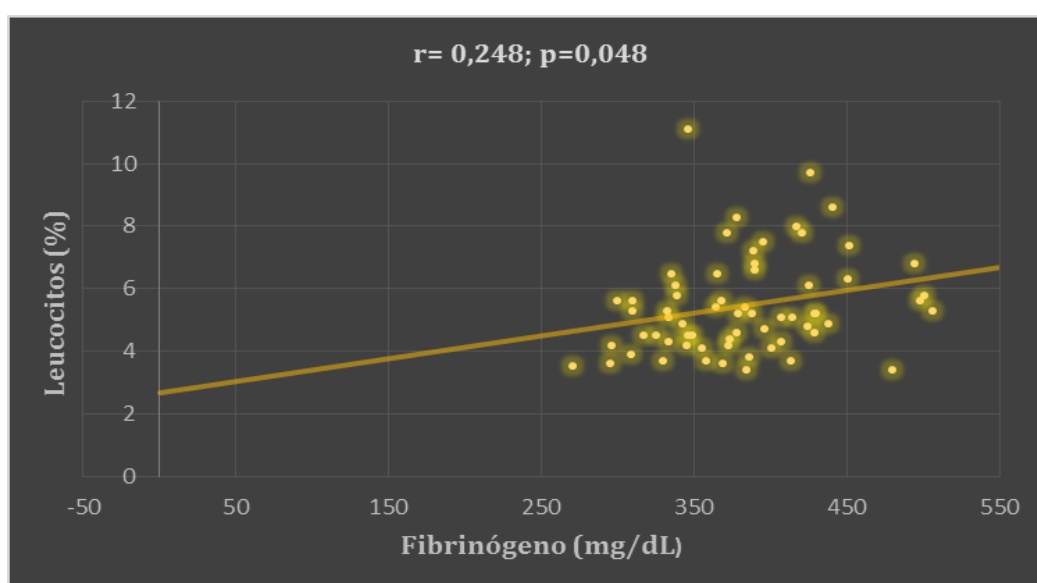
En el presente estudio, aparte de la relación establecida entre los niveles séricos de fibrinógeno y los niveles séricos de PCR-us, se han observado otras asociaciones directamente proporcionales y significativas entre el fibrinógeno y otros biomarcadores de inflamación y función vascular. Dichas relaciones las mantuvo el fibrinógeno con los niveles séricos de IL-6 ($r=0,257$; $p=0,046$) (**Gráfica 18**), con el porcentaje de leucocitos

séricos ($r=0,248$; $p=0,048$) (**Gráfica 19**), con los valores de la PAS ($r=0,330$; $p=0,015$) y con los valores de la PAD ($r=0,290$; $p=0,021$) (**Gráficas 20 y 21**). Esto indica que el fibrinógeno es una variable dependiente de diversos biomarcadores inflamatorios y de la función vascular.

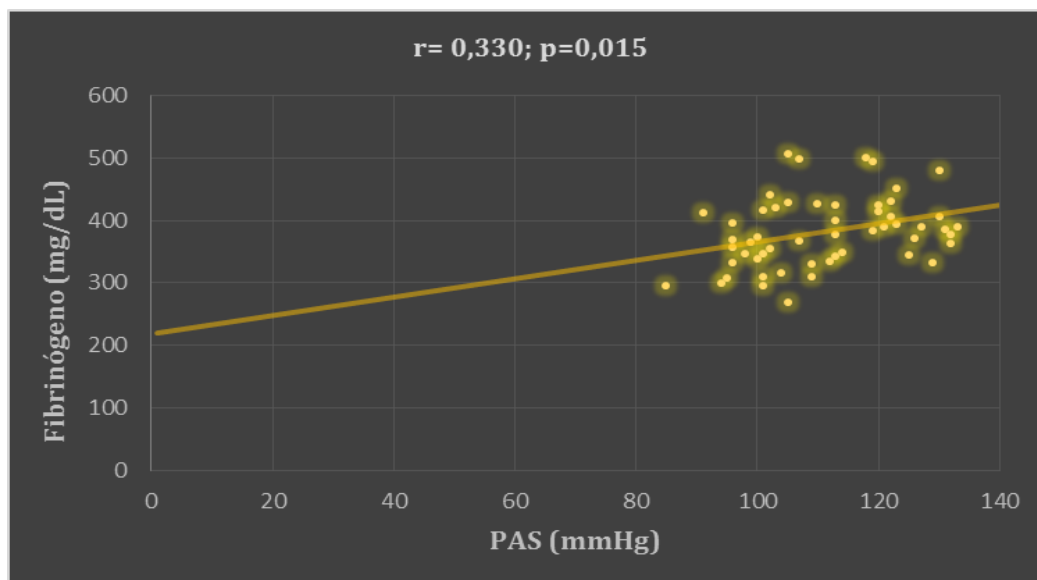
Gráfica 18. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y de IL-6 en la población total al inicio del estudio.



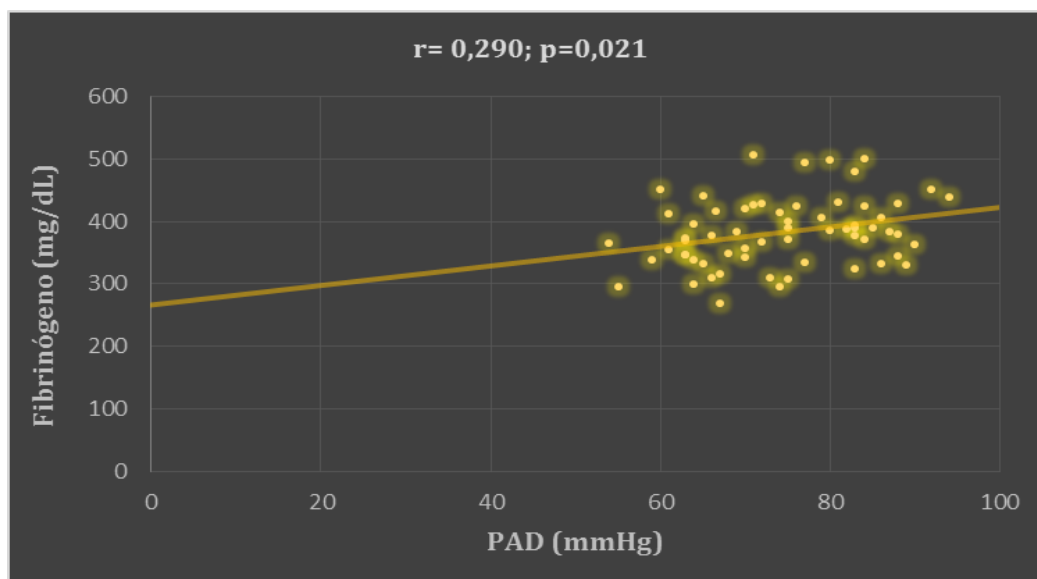
Gráfica 19. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y el porcentaje de leucocitos séricos en la población total al inicio del estudio.



Gráfica 20. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y los valores de PAS en la población total al inicio del estudio.



Gráfica 21. Correlación directamente proporcional entre los niveles séricos de fibrinógeno y los valores de PAD en la población total al inicio del estudio.



Por otro lado, las cascadas inflamatorias se propagan mediante mediadores proinflamatorios como la IL-6. La IL-6 es una citoquina que se produce en diversos tejidos y es inductora de una reacción multiorgánica que involucra al hígado, al sistema nervioso central, al sistema vascular, a la médula ósea y al sistema inmune. Los efectos

proinflamatorios de la IL-6 incluyen, como se ha comentado anteriormente, la estimulación de la producción de proteínas o reactantes de fase aguda, principalmente a nivel hepático, durante el proceso inflamatorio (Kerr et al. 2001; Woodward et al. 1999; Le & Vilcek 1989).

Diversos estudios que han evaluado el vínculo existente entre la ECV y la inflamación, se han centrado principalmente en reactivos de fase aguda como el fibrinógeno (Meade et al. 1993) y la PCR (Kuller et al. 1996), debido a que comparativamente son más estables. La IL-6 tiene una vida media corta en el organismo (<2 horas) y es propensa a presentar fluctuaciones, por lo que produce una mayor variabilidad intrasujeto. A pesar de este impedimento, varios estudios han observado una relación entre los niveles séricos elevados de IL-6 y un mayor riesgo de enfermedad coronaria (Danesh et al. 2008). Sin embargo, se han obtenido riesgos muy diversos (rango de OR: 1,0-3,0) (Danesh et al. 2008; Tzoulaki et al. 2007; Folsom et al. 2006; St-Pierre et al. 2005; Cesari et al. 2003; Ridker, Rifai, et al. 2000; Ridker, Hennekens, et al. 2000; Luc 2003). Esto puede deberse a que estos estudios no consideraron para el ajuste del modelo la variabilidad propia de la IL-6 (Danesh et al. 2008).

En revisiones como la realizada por Danesh y colaboradores, se puede observar la gran variabilidad intrasujeto interanual que presentan los valores séricos de IL-6 (ratios de dilución de regresión de 0,41 [IC_{95%} 0,28-0,53] en más de 4 años & ratios de dilución de regresión de 0,35 [IC_{95%} 0,23-0,48] en más de 12 años) (Danesh et al. 2008). En esta revisión, después de ajustar el análisis por la variabilidad de la IL-6 y por factores de riesgo establecidos, se observó un OR global para eventos coronarios de 2,14 [IC_{95%} 1,45-3,15]. Además de una relación entre los niveles séricos elevados de IL-6 y el aumento progresivo del riesgo de cardiopatía coronaria (Danesh et al. 2008). A este respecto, el metaanálisis realizado por el *IL-6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration* concluyó que existía una consistente asociación causal entre las vías relacionadas con el receptor de la IL-6 y la enfermedad coronaria (IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration et al. 2012).

En el presente estudio, al tener en cuenta esta variabilidad intrasujeto de los niveles de IL-6, se observó tras el consumo del Suplemento una tendencia a la disminución en los niveles séricos de IL-6 en los principales grupos evaluados (población total: de 3,20±7,27 a 1,56±2,21 pg/mL; p=0,052, sujetos con disfunción endotelial: de 3,81±8,47 a 1,78±2,63 pg/mL; p=0,075 y sujetos con niveles circulantes elevados de cLDLox: de 6,17±11,10 a 1,80±2,34 pg/mL; p=0,088) (**Tabla 32-34**).

Por otro lado, respecto a la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, *siglas en inglés*), es importante señalar que se trata de una molécula de adhesión expresada en las CEs activadas. La activación de las CEs, la cual es previa a la DE, se produce a través de diversos estímulos, entre los que se encuentran la unión de las cLDLox a su receptor *scavenger* situado en las CEs y la presencia de citoquinas proinflamatorias a nivel vascular (IL-1 β , TNF- α , PCR, etc.) (Takahashi et al. 1996).

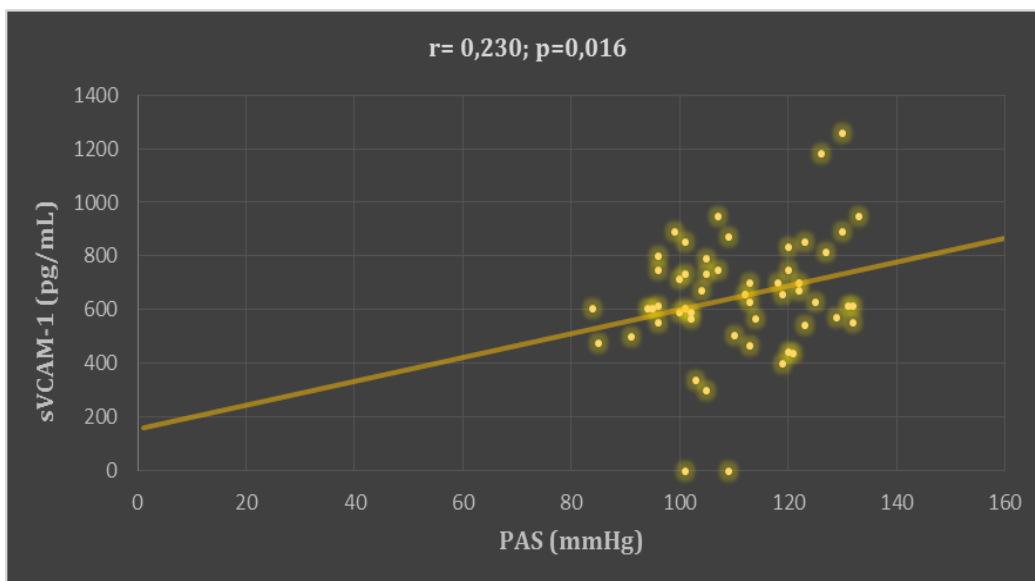
Esta molécula de adhesión se encuentra vinculada a la Aterosclerosis al facilitar la adhesión y la trans migración de leucocitos a la íntima arterial (Springer 1994). Siendo este paso crucial en la iniciación y progresión de la Aterosclerosis (Libby 2002; Ross 1999). En este sentido, diversos estudios han observado una mayor expresión de esta molécula de adhesión celular en diferentes componentes de la placa aterosclerótica (Poston et al. 1992; O'Brien et al. 1996). Además, los niveles circulantes solubles de dicha molécula de adhesión (sVCAM-1, *siglas en inglés*) parecen estar asociados con esta patología (Mulvihill et al. 2002; Ridker et al. 1998; Rohde et al. 1998; Hwang et al. 1997).

A este respecto, en el presente estudio no se observaron cambios significativos en los niveles circulantes de sVCAM-1 tras el consumo del Suplemento (**Tabla 32**), a pesar de haberse obtenido mejoras significativas en la función endotelial (**Tabla 26**). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en el metaanálisis realizado por Schwingshackl y colaboradores, donde no se observaron cambios significativos en los niveles circulantes de sVCAM-1 tras el consumo de aceite de oliva en sujetos en estadios tempranos de Aterosclerosis, pero sí se obtuvieron mejoras significativas en la función endotelial (Schwingshackl et al. 2015).

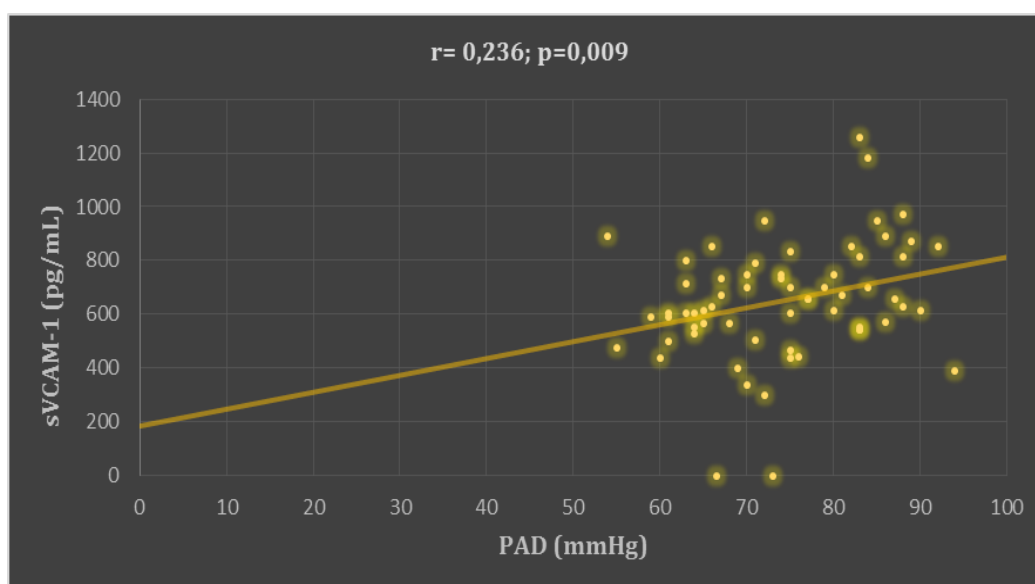
Por otro lado, en el presente estudio se observó una disminución significativa de los niveles circulantes de sVCAM-1 tras el periodo de intervención con Placebo (de 635,3 [IC_{95%} 591,1-679,6] a 588,7 [IC_{95%} 554,1-623,3] pg/mL; $p < 0,05$), sin observarse diferencias significativas entre los periodos de intervención (**Tabla 32**). Este descenso en los niveles de sVCAM-1 podría indicar una mejora en la función endotelial y por lo tanto, en la presión arterial. Sin embargo, cabe señalar que no se observaron mejoras significativas en ninguna de las variables englobadas en la función vascular tras el periodo de intervención con Placebo en los grupos evaluados (**Tablas 26-28, 35 y 36**). Esto podría deberse a que aun existiendo una relación directamente proporcional y significativa entre los niveles circulantes de sVCAM-1 y los valores de la PAS ($r = 0,230$; $p = 0,016$) (**Gráfica 22**) y de la PAD ($r = 0,236$; $p = 0,009$) (**Gráfica 23**), estas asociaciones se pierden cuando los sujetos presentan FRCV

como la DE, los niveles circulantes elevados de cLDLox, la preHTA sistólica o diastólica o la HTA. Al contrario de lo observado en la relación mantenida entre los niveles circulantes de cLDLox y la función endotelial, la cual se acentúa cuando los sujetos presentan FRCV emergentes (**Gráficas 10 y 11**), como se ha podido ver en apartados anteriores.

Gráfica 22. Correlación directamente proporcional entre los niveles circulantes de sVCAM-1 y los valores de PAS en la población total al inicio del estudio.



Gráfica 23. Correlación directamente proporcional entre los niveles circulantes de sVCAM-1 y los valores de PAD en la población total al inicio del estudio.



Los resultados obtenidos en el presente estudio en las variables inflamatorias están en consonancia con lo observado en diversos ensayos clínicos donde se ha evaluado el efecto del HT o de la PC en sujetos aparentemente sanos (Lockyer et al. 2015; Crespo et al. 2015; Mertens-Talcott et al. 2006). Esto se puede ver en estudios como el ensayo clínico cruzado realizado por Lockyer y colaboradores en sujetos aparentemente sanos, donde se administró de forma aguda un extracto de olivo (10 mg HT y 51 mg oleuropeína). En este estudio se observó una mejora significativa de la función vascular y de los niveles de interleucina-8 (IL-8), sin producirse cambios significativos en los niveles de IL-6 (Lockyer et al. 2015). Tampoco se observaron cambios en los niveles séricos de IL-6 en el estudio realizado por Crespo y colaboradores, donde se administró un suplemento rico en HT a diferentes dosis (5 y 25 mg/día de HT) en sujetos aparentemente sanos ($p=0,18$). Asimismo, en este estudio hubo una ausencia de efecto del tratamiento sobre los niveles circulantes de PCR-us ($p=0,117$) (Crespo et al. 2015).

En el estudio realizado por Mertens-Talcott y colaboradores en sujetos aparentemente sanos, a pesar de obtenerse un incremento significativo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, *siglas en inglés*) del plasma después del consumo de 800 mg de un extracto con polifenoles de granada (330,4 mg de PC y 21,6 mg de ácido elágico), no se observó descenso significativo en los niveles séricos de IL-6 (Mertens-Talcott et al. 2006).

Por otro lado, en el ensayo clínico cruzado llevado a cabo por de Bock y colaboradores en sujetos con sobrepeso, donde se administró un suplemento con polifenoles del olivo (9,7 mg/día de HT y 51,1 mg/día de oleuropeína) durante 12 semanas, no se observó efecto significativo del suplemento en los niveles séricos de PCR-us. Curiosamente, en este estudio se produjo un incremento significativo de los niveles séricos de IL-6 tras el suplemento ($p=0,014$), a la par que se obtenía una mejora del 15% en la sensibilidad a la insulina ($p=0,024$) y del 28% en la respuesta de la células β pancreáticas ($p=0,013$) comparado con el control (De Bock, Derraik, et al. 2013). Ante dichos eventos, los autores alegaron como la IL-6 funciona de forma diferente dependiendo de su concentración y del tejido sobre el que actúe, siendo posible que la producción aguda de esta citoquina produzca mejoras en el metabolismo de la glucosa al aumentar la sensibilidad a la insulina y la absorción de la glucosa a través de diferentes mecanismos (Carey et al. 2006; Weigert et al. 2006). Por el contrario, niveles ligeramente elevados de forma crónica son asociados con un estado de resistencia a la insulina proinflamatoria en el hígado (Kim et al. 2009).

En cambio, en estudios realizados en animales de experimentación (G. Li et al. 2015) o *in vitro* (Winand & Schneider 2014; Hollebeeck et al. 2012), sí se han observado descensos significativos en los niveles de IL-6 bajo ambientes proinflamatorios tras el tratamiento con PC. Como se puede observar en el estudio realizado por Li y colaboradores en ratones infectados con *Salmonella typhimurium* a los cuales se les administró PC. En este estudio se realizaron 4 grupos: I grupo sin infectar con *Salmonella typhimurium*, II grupo infectado por *Salmonella typhimurium*, pero sin administrarle el suplemento con PC, III grupo infectado de *Salmonella typhimurium* + suplemento de 250 µg/mL de PC y IV grupo infectado de *Salmonella typhimurium* + suplemento de 500 µg/mL de PC. Después de una semana con los tratamientos se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de IL-6 entre el grupo II y el grupo IV (dosis 500 µg/mL de PC) ($82,35 \pm 2,07$ vs. $64,53 \pm 4,34$ pg/mL, respectivamente; $p < 0,05$), aunque no se observaron diferencias significativas entre el grupo II y el grupo III (dosis de 250 µg/mL de PC) (G. Li et al. 2015).

En el estudio llevado a cabo por Hollebeeck y colaboradores en células Caco-2 derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, se administró PC (rango: de 0,1 a 100 µM) o un extracto de cáscara de granada rico en PC (rango: de 1,3 a 42,4 µM de PC) tras la provocación de un estado proinflamatorio agudo. En estas células Caco-2 inflamadas se observó que, tras la exposición a la PC o al extracto rico en PC, existía un descenso significativo de los niveles de IL-6 ($p < 0,001$) en los compartimentos apicales comparado con los controles no tratados. No se observaron efectos sobre la secreción de la IL-6 cuando las dosis de PC fueron entre 0,1 y 10 µM, en cambio cuando la concentración fue de 25 µM disminuyó significativamente la secreción de IL-6 al 46% comparado con las células control (Hollebeeck et al. 2012).

En el estudio realizado por Winand y colaboradores en adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264,7 sometidos previamente a un ambiente proinflamatorio, se administró un extracto de granada (4 µM de PC y 24 µM de ácido elágico), y se evaluaron los efectos antiinflamatorios conjuntos y de sus diversos componentes en las células cultivadas de forma independiente y conjunta (cocultivo). En el cocultivo solo la PC disminuyó significativamente los niveles de IL-6, mientras que con el extracto de granada global este efecto no se observó. En las células cultivadas de forma independiente solo la PC consiguió disminuir significativamente los niveles de IL-6 después de 48 horas en los macrófagos inflamados. En los adipocitos inflamados la PC disminuyó la secreción de IL-6 en un 95%, consiguiendo un descenso por debajo de los controles (Winand & Schneider 2014).

Por otra parte, en diversos estudios y revisiones se han observado otros mecanismos por los cuales el HT puede ejercer sus efectos antiinflamatorios (Lama et al. 2016; Silva et al. 2015; Scoditti et al. 2015; Rosignoli et al. 2013; Bulotta et al. 2014; Hu et al. 2014; Ciccerale et al. 2012; Widmer et al. 2013; Zhang et al. 2009; Gong et al. 2009). Entre estos mecanismos se encuentran el descenso de los leucocitos observado en humanos con Aterosclerosis temprana y DE (Widmer et al. 2013); el descenso de los niveles de $\text{TNF}\alpha$, de IL-1 y de mieloperoxidasa (MPO) observado en animales de experimentación sometidos a ambientes proinflamatorios (López-Villodres et al. 2016; Gong et al. 2009) o dieta aterogénica (Lama et al. 2016); y la atenuación de la transcripción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *siglas en inglés*) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) observado *in vitro* bajo ambiente proinflamatorio (Zhang et al. 2009).

Además de otros mecanismos observados en diversos estudios, cómo el realizado por Scoditti y colaboradores en adipocitos humanos y murinos bajo ambiente proinflamatorio. En este estudio se observó tras la administración de HT o de ácido oleico una disminución significativa de la secreción de adiponectina en un 42%, además de prevenir en un 35% la baja expresión de PPAR- γ e inhibir en un 55% la fosforilación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK, *siglas en inglés*) (Scoditti et al. 2015).

En el estudio *in vitro* realizado por Rosignoli y colaboradores en monocitos humanos obtenidos de donantes aparentemente sanos, se observó que el tratamiento con 100 μM de HT, además de provocar una considerable reducción de la expresión de COX-2 tanto a nivel del ARNm como de la proteína ($p < 0,05$), inhibía significativamente la producción del anión superóxido en un 40% ($p < 0,05$) y disminuía de forma dosis-dependiente los niveles de prostaglandinas E2 (PGE2) (dosis de 50 μM de HT: 45% vs. dosis de 100 μM de HT: 71%; $p < 0,05$) (Rosignoli et al. 2013).

En el estudio realizado por Silva y colaboradores en ratas con artritis reumatoide se observó tras la administración de aceite de oliva refinado enriquecido con 5 mg/kg de HT, aparte de una disminución significativa en los niveles de $\text{TNF}\alpha$ ($p < 0,005$) y en la expresión de la COX-2 ($p < 0,001$) y de la iNOS ($p < 0,001$), una disminución del daño artrítico en las patas de dichas ratas ($p < 0,01$) comparado con el control. Las dosis de 0,5 mg/kg y de 5,0 mg/kg de HT consiguieron disminuir significativamente el edema agudo de las extremidades inferiores en estos animales ($p < 0,001$) (Silva et al. 2015).

Este efecto supresor de los polifenoles del aceite de oliva sobre la expresión de la enzima COX-2, también se ha observado en ensayos clínicos donde se ha evaluado la expresión génica (Camargo et al. 2010). Un ejemplo de ello es el ensayo clínico cruzado realizado por Camargo y colaboradores en sujetos con síndrome metabólico, donde se administró de forma aguda aceite de oliva virgen extra con alto contenido fenólico (398 ppm) y aceite de oliva con bajo contenido fenólico (70 ppm). En este estudio, tras el consumo de los diversos aceites de oliva, se observó diferencias en la expresión de 98 genes durante el periodo postprandial (79 genes disminuyeron su expresión y 19 genes se sobreexpresaron). El trastorno inflamatorio fue el más representado con 39 genes, de los cuales 35 genes disminuyeron su expresión y 4 genes se sobreexpresaron tras la ingesta del aceite de oliva con alto contenido fenólico. En este sentido, uno de los genes más significativos que disminuyó su expresión fue PTGS2 encargado de codificar a la COX-2 (Camargo et al. 2010).

En el estudio llevado a cabo por López-Villodres y colaboradores en ratas diabéticas a las que se les administró HT a diferentes dosis (0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/kg/día), se observó una reducción significativa en los niveles de diferentes marcadores inflamatorios (MPO: reducción del 34%, VCAM-1: reducción del 31% y IL-1 β : reducción del 17%) comparado con las ratas no tratadas con HT. Asimismo descendieron, aunque no significativamente, los niveles totales de leucocitos tras el tratamiento con HT. A esto hay que añadir que el tratamiento con HT redujo en un 47% los niveles circulantes de cLDLox en las ratas diabéticas, además de incrementar significativamente los niveles de NO(x) (solo a dosis de 10 mg/kg/día) y mejorar la histología vascular. Los efectos beneficiosos observados sobre la histología vascular fueron una disminución del 13% del grosor del área vascular (aunque la dosis de 10 mg/kg/día no tuvo efecto en esta variable) y un descenso en el número de CMLVs del 7%, comparado con las ratas diabéticas no tratadas con HT (López-Villodres et al. 2016). Cabe señalar que muchos de los efectos fueron dependientes de la dosis administrada.

En el ensayo clínico realizado por Widmer y colaboradores en 82 sujetos con Aterosclerosis temprana y DE, se administraron 30 mL/día de un aceite rico en polifenoles (OO: 340 mg/kg de contenido fenólico) o 30 mL/día de un aceite de oliva rico en polifenoles enriquecido en catequinas como la epigallocatequina-3-galato (EGCG: 600 mg/kg contenido fenólico). En este estudio no se observaron cambios significativos en los niveles séricos de PCR-us (de 0,10 a 0,09 mg/L; $p=0,22$), de IL-6 (de 1,3 a 1,3 pg/mL; $p=0,52$) o de sVCAM-1 (de 575 a 560 pg/mL; $p=0,07$). Sin embargo, sí se observó que, tras el tratamiento con el aceite de oliva rico en polifenoles (OO), existió un aumento significativo de la función

endotelial en los sujetos con DE (IHR <1,6) (de $1,38 \pm 0,15$ a $1,60 \pm 0,3$; $p=0,004$), a la par que se observaba una reducción significativa en el número total de leucocitos (de 6,0 a $5,8 \times 10^9/L$; $p<0,05$), de linfocitos (de 1,85 a $1,60 \times 10^9/L$; $p=0,005$) y de monocitos (de 0,48 a $0,44 \times 10^9/L$; $p=0,047$). Los autores de este estudio concluyeron que la mejora de la DE asociada a una reducción significativa de los leucocitos podía sugerir un mecanismo importante en la recuperación de la función endotelial (Widmer et al. 2013). A este respecto, estos investigadores comentan como mecanismos de acción que producen la mejora de la biodisponibilidad del NO y por ende, la mejora en la vasodilatación mediada por esta molécula, pueden ser estimulados a través de una reducción en los marcadores inflamatorios asociados con los leucocitos. En este sentido, se ha observado como la MPO interfiere en la producción de tetrahidrobiopterina y con la posterior liberación, biodisponibilidad y mecanismo de acción del NO (Higashi et al. 2006; Schmidt et al. 1992). Así, los mediadores celulares inflamatorios reducen considerablemente la producción o biodisponibilidad del NO, o aumentan la producción de EROs que interfieren en la capacidad de la tetrahidrobiopterina para participar en la biosíntesis del NO (Schmidt et al. 1992). Por consiguiente, la reducción de los mediadores inflamatorios leucocitarios permitiría una mayor vasodilatación mediada por el NO y una función endotelial mejorada, lo que podría ser la base, según estos autores, de la mejora endotelial vascular observada tras la ingesta de polifenoles del aceite de oliva (Widmer et al. 2013).

A este respecto, en el estudio realizado por Lavi y colaboradores en 881 sujetos se evaluó los posibles mecanismos por los cuales el tabaquismo puede incrementar los eventos CV. En este estudio los sujetos fumadores presentaban, comparado con los no fumadores, una mayor vasoconstricción epicárdica en respuesta a la acetilcolina intracoronaria (-19 vs. -14%, respectivamente; $p=0,03$) y más probabilidades de sufrir DE epicárdica (46 vs. 35%, respectivamente; $p=0,005$). Estos sujetos también presentaban mayores niveles séricos de leucocitos ($7,7 \pm 0,2$ vs. $6,6 \pm 0,1 \times 10^9/L$, respectivamente; $p<0,001$), de MPO (156 ± 19 vs. 89 ± 8 ng/mL, respectivamente) y de sICAM-1 (283 ± 14 vs. 252 ± 5 ng/mL, respectivamente). Todo esto a pesar de que los fumadores fueron significativamente más jóvenes que los no fumadores ($p<0,001$). Por otra parte, en este estudio no se observaron diferencias significativas entre los fumadores y los no fumadores en los niveles séricos de PCR-us, fibrinógeno y sVCAM-1. Dichos autores concluyeron que el tabaquismo se encuentra asociado a la DE coronaria epicárdica y a niveles séricos elevados de leucocitos en sujetos con enfermedad arterial coronaria temprana (Lavi et al. 2007).

De esta manera, los niveles séricos elevados de leucocitos podrían ser un biomarcador inflamatorio asociado a la DE y al RCV (Widmer et al. 2013; Ndrepepa et al. 2009; Stewart et al. 2005; Lavi et al. 2007). En este sentido, en el presente estudio se observó una tendencia al incremento en los niveles séricos de leucocitos tras el periodo de intervención con Placebo (de $5,69 \pm 1,56$ a $5,92 \pm 1,68\%$; $p=0,052$), mientras que dicho aumento no se produjo tras el consumo del Suplemento. Además, se observó una relación directamente proporcional entre los niveles séricos de leucocitos y los niveles séricos de PCR ($r=0,342$; $p=0,005$) y de fibrinógeno ($r=0,248$; $p=0,048$).

En conclusión, en el presente estudio además de observarse la dependencia de diversos biomarcadores inflamatorios entre sí y su relación con algunas variables de la función vascular, se ha podido ver que no se producen apenas modificaciones en sujetos aparentemente sanos que presentan niveles séricos de PCR-us, fibrinógeno e IL-6 dentro de los rangos de normalidad. Sin embargo, cuando los sujetos presentan niveles por encima de la normalidad o se tiene en cuenta la dependencia y la variabilidad de estos biomarcadores, se observan tendencias hacia el descenso en diversas variables tras el consumo del suplemento. Los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran en consonancia con lo observado en diversos ensayos clínicos, donde se ha evaluado el efecto del HT o de la PC en sujetos aparentemente sanos (Lockyer et al. 2015; Crespo et al. 2015; Mertens-Talcott et al. 2006).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La Aterosclerosis es la principal causa de Enfermedad Cardiovascular (ECV) y de mortalidad en todo el mundo. Por esta razón, es considerada como una importante epidemia de salud pública internacional. La enfermedad aterosclerótica es una enfermedad compleja y de lenta progresión, que se desarrolla de forma silenciosa a lo largo de los años en las paredes de las arterias de mediano y/o gran calibre. En el momento en que se manifiestan los síntomas, generalmente a mediana edad, el proceso aterosclerótico suele estar en una fase avanzada. En esta etapa pueden darse lugar eventos cardiovasculares (CV) agudos que conducen, frecuentemente, a la muerte antes de que se pueda dispensar la atención médica necesaria.

Por este motivo, la prevención primaria en esta enfermedad es fundamental para prevenir su progresión y complicaciones. En este sentido, han destacado desde hace años por su importancia en todo el proceso aterosclerótico la disfunción endotelial y los niveles elevados de cLDLox. Estos factores son claves tanto para la iniciación, como para la progresión y desestabilización de la Aterosclerosis. Por esta razón, la disfunción endotelial y los niveles circulantes elevados de cLDLox son considerados como importantes factores de riesgo cardiovascular (FRCV) y predictores tanto de la presencia de ECV aterosclerótica como de futuros eventos CV, incluso entre sujetos asintomáticos de ECV o aparentemente sanos.

A este respecto, en el panorama científico de los últimos años ha destacado el efecto antiaterosclerótico de polifenoles como el hidroxitirosol (HT) y la punicalagina (PC). Esto es debido a que estos polifenoles protegen frente a la disfunción endotelial y la oxidación de las cLDL, entre otros efectos. Por todo esto y en base a lo previamente observado en un estudio piloto realizado por el Grupo de Investigación en de Nutrición y Alimentos Funcionales (NUTRinvest) y la Unidad de Nutrición Clínica y Dietética del HULP, se plantea la hipótesis de que el consumo combinado de estos polifenoles tenga un efecto sinérgico que potencie los efectos antiateroscleróticos de cada uno de ellos, especialmente en la función endotelial y en los niveles de cLDLox.

En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto antiaterosclerótico en diferentes marcadores tempranos de la Aterosclerosis del consumo combinado del HT y la PC en población de mediana edad, aparentemente sana sin ECV establecida. Para dicho fin, se diseñó un ensayo clínico cruzado, controlado, aleatorizado y doble ciego constituido por dos secuencias de intervención. Cada una de la secuencias de intervención estuvo formada por dos periodos de intervención con una duración de 8 semanas cada uno de ellos y un periodo de lavado de 4 semanas entre ambos. Para la realización de este estudio se seleccionaron 84 sujetos, de los cuales 67 fueron los que finalizaron íntegramente el estudio y los incluidos en el análisis estadístico.

En este estudio se evaluaron diversas variables de la función vascular, del estado oxidativo, del estado inflamatorio, del perfil glucémico y lipídico, etc. Centrándonos de forma especial en la función endotelial y los niveles circulantes de cLDLox.

En función de los principales resultados observados se han llegado a las siguientes conclusiones:

1. La función endotelial mejoró de manera significativa en la población total tras el consumo del suplemento, siendo más acusada esta mejora en aquellos sujetos que padecían de disfunción endotelial (70,2%).
2. El suplemento también mostró un efecto hipotensor, el cual condujo a que los sujetos con preHTA e HTA recuperaran los valores de normotensión tanto en la presión arterial sistólica como en la presión arterial diastólica.
3. El estado oxidativo de la población analizada mejoró tras el consumo del suplemento. En este sentido, destaca el descenso significativo de los niveles circulantes de cLDLox observado tras el periodo de intervención con el suplemento. Este efecto protector frente a la oxidación de las cLDL fue aún más acusado en los sujetos que presentaban niveles elevados de cLDLox. Asimismo, se observaron mejoras en los niveles séricos de 8-isoprostanos y de NO(x) en diversos grupos evaluados.
4. Los sujetos con dislipemias vieron mejorado su perfil lipídico (niveles de colesterol total, cLDL, cHDL y triglicéridos) tras el consumo del suplemento. Mientras lo sujetos que presentaban un adecuado perfil lipídico no vieron alterados sus parámetros. Por otra parte, este efecto protector del suplemento sobre el perfil lipídico no se observó

sobre la glucemia basal, ya que los sujetos con glucemias prediabéticas no vieron mejorado su perfil glucémico.

5. En el estado inflamatorio no se observaron cambios relevantes tras el consumo del suplemento, aunque se produjo un descenso en la mayoría de los grupos evaluados de la PCR-us y del fibrinógeno tras el consumo del mismo. Al contrario de lo que se observó tras el periodo de intervención con placebo, donde se produjo un aumento de dichos parámetros. Posiblemente los cambios en el estado inflamatorio no fueron más acusados al no presentar un estado proinflamatorio importante la población estudiada.
6. No se observaron eventos/efectos adversos ni signos/síntomas de baja tolerancia durante el estudio en ninguna de las intervenciones evaluadas. A este respecto, cabe desatacar la elevada adherencia registrada durante el estudio a las diversas intervenciones (>90%).

Según los resultados expuestos en el presente estudio, la conclusión general obtenida es que el consumo durante 8 semanas de un suplemento con HT y PC mejora marcadores tempranos de la Aterosclerosis en sujetos de mediana edad, aparentemente sanos sin ECV establecida. Asimismo, el suplemento con HT y PC presenta efectos antiateroscleróticos al mejorar la función endotelial, la presión arterial y los niveles circulantes de cLDL_{ox}, especialmente en aquellas personas que presentan estos parámetros alterados. En consecuencia, el consumo de polifenoles como el HT y PC podría contribuir en la prevención primaria de la Aterosclerosis, al disminuir el RCV aterosclerótico que presentan estos sujetos.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abderrahmani, A. et al., 2007. Human high-density lipoprotein particles prevent activation of the JNK pathway induced by human oxidised low-density lipoprotein particles in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 50(6), pp.1304–1314.
- Achmon, Y. & Fishman, A., 2015. The antioxidant hydroxytyrosol: biotechnological production challenges and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), pp.1119–30.
- ADA, 2012. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. The American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 35 Suppl 1(Suppl 1), pp.S64-71.
- Aggarwal, B.B. & Shishodia, S., 2004. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1030(1), pp.434–41.
- Agouridis, A.P. et al., 2013. Does Combination Therapy with Statins and Fibrates Prevent Cardiovascular Disease in Diabetic Patients with Atherogenic Mixed Dyslipidemia? *The Review of Diabetic Studies*, 10(2–3), pp.171–190.
- AHA, 2016a. All About Heart Rate (Pulse). The American Heart Association. Available at: http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/More/MyHeartandStrokeNews/All-About-Heart-Rate-Pulse_UCM_438850_Article.jsp#.V8WklvmLTIU [Accessed August 30, 2016].
- AHA, 2016b. The American Heart Association's Diet and Lifestyle Recommendations. Available at: http://www.heart.org/HEARTORG/HealthyLiving/HealthyEating/Nutrition/The-American-Heart-Associations-Diet-and-Lifestyle-Recommendations_UCM_305855_Article.jsp#.WMFNhG81_IU [Accessed July 18, 2016].
- Ahmed, M.M. et al., 2015. Anti-obesity effects of Taif and Egyptian pomegranates: molecular study. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(4), pp.598–609.
- Ajilore, O., Lamar, M. & Kumar, A., 2014. Association of brain network efficiency with aging, depression, and cognition. *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 22(2), pp.102–10.
- Al-Attar, A.M. & Shawush, N.A., 2015. Influence of olive and rosemary leaves extracts on chemically induced liver cirrhosis in male rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), pp.157–63.
- Al-Azzawie, H.F. & Alhamdani, M.-S.S., 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, 78(12), pp.1371–7.
- Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P. & Shaw, J., 2006. Metabolic syndrome -a new world- wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine: a Journal of the British Diabetic Association*, 23(5), pp.469–80.
- Alissa, E.M. & Ferns, G.A., 2017. Dietary Fruits and Vegetables and Cardiovascular Diseases Risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), pp.1950–1962.
- Allison, B.A. et al., 1999. Effects of native, triglyceride-enriched, and oxidatively modified LDL on plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(5), pp.1354–60.

- Al-Muammar, M.N. & Khan, F., 2012. Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28(6), pp.595–604.
- Amato, M.C., Guarnotta, V. & Giordano, C., 2013. Body composition assessment for the definition of cardiometabolic risk. *Journal of Endocrinological Investigation*, 36(7), pp.537–43.
- Ambrose, J.A. & Barua, R.S., 2004. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(10), pp.1731–1737.
- Amezcu-Guerra, L.M., Springall del Villar, R. & Bojalil Parra, R., 2007. [C-reactive protein: cardiovascular issues of an acute-phase protein]. *Archives of Cardiology of Mexico*, 77(1), pp.58–66.
- Anon, 2013. Social engagement and healthy aging. A rich web of human relationships enhances your health and stimulates your mind and memory. *Harvard Men's Health Watch*, 17(8), p.6.
- Antoniades, C., Tousoulis, D. & Stefanadis, C., 2008. Smoking in Asians: It doesn't stop at vascular endothelium. *International Journal of Cardiology*, 128(2), pp.151–153.
- Appiah, D. et al., 2015. Association of Plasma γ' Fibrinogen With Incident Cardiovascular Disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(12), pp.2700–6.
- Appiah, D. et al., 2016. Relation of longitudinal changes in body mass index with atherosclerotic cardiovascular disease risk scores in middle-aged black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Annals of Epidemiology*, 26(8), pp.521–526.
- Arabshahi, S. et al., 2014. Adiposity has a greater impact on hypertension in lean than not-lean populations: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*, 29(5), pp.311–324.
- Arca, M. et al., 2007. Usefulness of Atherogenic Dyslipidemia for Predicting Cardiovascular Risk in Patients With Angiographically Defined Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology*, 100(10), pp.1511–1516.
- Arellano, J.L.P., 2013. *Manual de Patología General*. Sisinio De Castro. 7^a, Elsevier.
- Armstrong, D.A., 1992. Oxidized LDL ceroid, and prostaglandin metabolism in human atherosclerosis. *Medical Hypotheses*, 38(3), pp.244–8.
- Arrebola-Moreno, A.L., Laclaustra, M. & Kaski, J.C., 2012. Noninvasive evaluation of endothelial function in clinical practice. *Spanish Journal of Cardiology*, 65(1), pp.80–90.
- Arsenault, B.J., Boekholdt, S.M. & Kastelein, J.J.P., 2011. Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 8(4), pp.197–206.
- Ashor, A.W. et al., 2015. Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 113(8), pp.1182–1194.
- Ashor, A.W. et al., 2014. Effect of vitamin C on endothelial function in health and disease: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis*, 235(1), pp.9–20.
- Åstrand, H. et al., 2011. In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the

- mechanical properties in the human abdominal aorta: effect of age and sex. *Journal of Applied Physiology*, 110(1).
- Añón-Calles, D., Canut, L. & Visioli, F., 2013. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 55, pp.498–504.
- Aviram, M., 1996. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(8), pp.599–608.
- Aviram, M. et al., 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 23(3), pp.423–33.
- Aviram, M. et al., 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), pp.1062–76.
- Aviram, M. et al., 2002. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 28(2–3), pp.49–62.
- Aviram, M. et al., 2008. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), pp.1148–57.
- Avogaro, A., Kreutzenberg, S.V. de & Fadini, G., 2008. Endothelial dysfunction: Causes and Consequences in patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82, pp.S94–S101.
- Babizhayev, M.A., Vishnyakova, K.S. & Yegorov, Y.E., 2014. Oxidative damage impact on aging and age-related diseases: drug targeting of telomere attrition and dynamic telomerase activity flirting with imidazole-containing dipeptides. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 8(3), pp.163–92.
- Badimón, L. & Martínez-González, J., 2002. Endothelium and vascular protection: an update. *Spanish Journal of Cardiology*, 55 Suppl 1, pp.17–26.
- Badimón, L., Vilahur, G. & Padró, T., 2009. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Spanish Journal of Cardiology*, 62(10), pp.1161–1178.
- Balasubramanian, P., Mattison, J.A. & Anderson, R.M., 2017. Nutrition, metabolism, and targeting aging in non human primates. *Ageing Research Reviews*, pii: S1568.
- Ball, R.Y. et al., 1995. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*, 114(1), pp.45–54.
- Ballantyne, C.M. & Hoogeveen, R.C., 2003. Role of lipid and lipoprotein profiles in risk assessment and therapy. *American Heart Journal*, 146(2), pp.227–33.
- Banihani, S.A. et al., 2014. Fresh pomegranate juice ameliorates insulin resistance, enhances β -cell function, and decreases fasting serum glucose in type 2 diabetic patients. *Nutrition Research*,

- 34(10), pp.862–867.
- Banihani, S., Swedan, S. & Alguraan, Z., 2013. Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 33(5), pp.341–348.
- Barja, G., 2013. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(12), pp.1420–45.
- Barja, G. & Herrero, A., 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(2), pp.312–8.
- Barnoya, J. & Glantz, S.A., 2005. Cardiovascular Effects of Secondhand Smoke: Nearly as Large as Smoking. *Circulation*, 111(20), pp.2684–2698.
- Barquera, S. et al., 2015. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of Medical Research*, 46(5), pp.328–38.
- Barr, E.L.M. et al., 2007. Risk of Cardiovascular and All-Cause Mortality in Individuals With Diabetes Mellitus, Impaired Fasting Glucose, and Impaired Glucose Tolerance . *Circulation* , 116(2), pp.151–157.
- Barrett, A. et al., 2013. Inhibition of α -Amylase and Glucoamylase by Tannins Extracted from Cocoa, Pomegranates, Cranberries, and Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(7), pp.1477–1486.
- Barton, M., Baretella, O. & Meyer, M.R., 2012. Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), pp.591–602.
- Basarici, I. et al., 2007. Associations of isoprostanes-related oxidative stress with surrogate subclinical indices and angiographic measures of atherosclerosis. *Coronary Artery Disease*, 18(8), pp.615–20.
- Basarici, I. et al., 2008. Urinary 8-isoprostane levels can indicate the presence, severity and extent of angiographic coronary artery disease. *Cardiologic Acta*, 63(4), pp.415–22.
- Basu, A. & Penugonda, K., 2009. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*, 67(1), pp.49–56.
- Baumert, J. et al., 2014. No Evidence for Genome-Wide Interactions on Plasma Fibrinogen by Smoking, Alcohol Consumption and Body Mass Index: Results from Meta-Analyses of 80,607 Subjects. *PLOS ONE*, 9(12), p.e111156.
- Bautista, L.E., 2003. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. *Journal of Human Hypertension*, 17(4), pp.223–30.
- Bayés, B. et al., 2003. Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in haemodialysis patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(1), pp.106–12.
- Bayés, B. et al., 2006. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular mortality in haemodialysis-role of seniority and intravenous ferrotherapy: analysis at 4 years of follow-up. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(4), pp.984–90.

- Bazzano, L.A., Serdula, M.K. & Liu, S., 2003. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 5(6), pp.492–9.
- Beavers, D.P. et al., 2012. Exposure to isoflavone-containing soy products and endothelial function: A Bayesian meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(3), pp.182–191.
- Bellesia, A., Verzelloni, E. & Tagliazucchi, D., 2015. Pomegranate ellagitannins inhibit α -glucosidase activity *in vitro* and reduce starch digestibility under simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(1), pp.85–92.
- Bender, A. et al., 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature Genetics*, 38(5), pp.515–517.
- Bendinelli, B. et al., 2011. Fruit, vegetables, and olive oil and risk of coronary heart disease in Italian women: the EPICOR Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(2), pp.275–83.
- Benetos, A. et al., 2002. Prognostic value of systolic and diastolic blood pressure in treated hypertensive men. *Archives of Internal Medicine*, 162(5), pp.577–81.
- Benjamin, E.J. et al., 2004. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 109(5), pp.613–9.
- Benn, M. et al., 2012. Nonfasting glucose, ischemic heart disease, and myocardial infarction: a Mendelian randomization study. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(25), pp.2356–65.
- Ben-Sadoun, G. et al., 2016. Physical and Cognitive Stimulation Using an Exergame in Subjects with Normal Aging, Mild and Moderate Cognitive Impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53(4), pp.1299–1314.
- Benzie, I.F. & Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), pp.70–6.
- Berneis, K. et al., 2009. The predictive role of atherogenic dyslipidemia in subjects with non-coronary atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 406(1–2), pp.36–40.
- Bertomeu Ruiz, A. & Zambón Rados, D., 2002. Atherogenic plaque: pathophysiology and clinical consequences. *Integral Medicine*, 40(9), pp.394–405.
- Bhakdi, S., 1998. An alternative hypothesis of the pathogenesis of atherosclerosis. *Herz*, 23(3), pp.163–7.
- Blain, H. et al., 2001. Influence of muscle strength and body weight and composition on regional bone mineral density in healthy women aged 60 years and over. *Gerontology*, 47(4), pp.207–12.
- Blekas, G. et al., 2002. Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), pp.3688–92.
- Bloch, E. et al., 2017. Genetic and Environmental Factors Associated With the Ganglion Cell Complex in a Healthy Aging British Cohort. *JAMA Ophthalmology*, 135(1), p.31.
- Bloomer, R.J., 2007. Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake. *Nutrition Journal*, 6(1), p.39.
- Del Bo', C. et al., 2015. Berries and oxidative stress markers: an overview of human intervention

- studies. *Food & Function*, 6(9), pp.2890–917.
- De Bock, M., Thorstensen, E.B., et al., 2013. Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(11), pp.2079–85.
- De Bock, M., Derraik, J., et al., 2013. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLOS ONE*, 8(3), p.e57622.
- Böger, R.H. et al., 2004. Hypercholesterolemia impairs basal nitric oxide synthase turnover rate: a study investigating the conversion of l-[guanidino-15N₂]-arginine to 15N-labeled nitrate by gas chromatography–mass spectrometry. *Nitric Oxide*, 11(1), pp.1–8.
- Böger, R.H., Vallance, P. & Cooke, J.P., 2003. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atherosclerosis Supplements*, 4(4), pp.1–3.
- Bolton, E. & Rajkumar, C., 2011. The ageing cardiovascular system. *Reviews in Clinical Gerontology; Cambridge*, 21(2), p.99–109.
- Di Bona, D. et al., 2014. Association of Klotho Polymorphisms with Healthy Aging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Rejuvenation Research*, 17(2), pp.212–216.
- Bondia-Pons, I. et al., 2007. Compliance with the European and national nutritional objectives in a Mediterranean population. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(12), pp.1345–51.
- Bonetti, P.O., Lerman, L.O. & Lerman, A., 2003. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), pp.168–75.
- Bonomini, F. et al., 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology*, 23(3), pp.381–90.
- Bosomworth, N.J., 2013. Approach to identifying and managing atherogenic dyslipidemia: a metabolic consequence of obesity and diabetes. *Canadian Family Physician*, 59(11), pp.1169–80.
- Bottino, D.A. et al., 2015. Relationship between biomarkers of inflammation, oxidative stress and endothelial/microcirculatory function in successful aging versus healthy youth: a transversal study. *BMC Geriatrics*, 15, p.41.
- Boulanger, C.M. et al., 1992. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circulation Research*, 70(6), pp.1191–7.
- Bovalino, S., Charleson, G. & Szoeki, C., 2016. The impact of red and processed meat consumption on cardiovascular disease risk in women. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(3), pp.349–54.
- Bowling, A. & Grundy, E., 1997. Activities of daily living: changes in functional ability in three samples of elderly and very elderly people. *Age and Ageing*, 26(2), pp.107–14.
- Boyko, E.J. et al., 2000. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*, 23(4), pp.465–71.
- Brenes, M. et al., 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), pp.3535–40.
- Britten, M.B., Zeiher, A.M. & Schächinger, V., 1999. Clinical importance of coronary endothelial

- vasodilator dysfunction and therapeutic options. *Journal of Internal Medicine*, 245(4), pp.315–27.
- Brook, R.D. et al., 2004. Effect of short-term weight loss on the metabolic syndrome and conduit vascular endothelial function in overweight adults. *The American Journal of Cardiology*, 93(8), pp.1012–1016.
- Brook, R.D. et al., 2001. Usefulness of visceral obesity (waist/hip ratio) in predicting vascular endothelial function in healthy overweight adults. *The American Journal of Cardiology*, 88(11), pp.1264–9.
- Brown, I.J. et al., 2009. Salt intakes around the world: implications for public health. *International Journal of Epidemiology*, 38(3), pp.791–813.
- Buckland, G., Travier, N., et al., 2012. Olive oil intake and CHD in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Spanish cohort. *The British Journal of Nutrition*, 108(11), pp.2075–82.
- Buckland, G., Mayén, A.L., et al., 2012. Olive oil intake and mortality within the Spanish population (EPIC-Spain). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(1), pp.142–9.
- Buckley, D.I. et al., 2009. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 151(7), pp.483–95.
- Bulotta, S. et al., 2014. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), p.219.
- Burgos Alves, M.I. et al., 2010. Oxidized LDL and its correlation with lipid profile and oxidative stress biomarkers in young healthy Spanish subjects. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 66(3), pp.221–7.
- Burke, A. & Fitzgerald, G.A., 2003. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 46(1), pp.79–90.
- Cahill, P.A. & Redmond, E.M., 2012. Alcohol and cardiovascular disease--modulation of vascular cell function. *Nutrients*, 4(4), pp.297–318.
- Cahill, P.A. & Redmond, E.M., 2016. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, 248, pp.97–109.
- Camargo, A. et al., 2010. Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC Genomics*, 11, p.253.
- Campbell, J.H. & Campbell, G.R., 1994. The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 5(5), pp.323–30.
- Campia, U., Tesauero, M. & Cardillo, C., 2012. Human obesity and endothelium-dependent responsiveness. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), pp.561–73.
- Cannon, B., 2013. Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. *Nature*, 493(7434), pp.S2-3.
- Canoy, D. et al., 2013. Body mass index and incident coronary heart disease in women: a population-based prospective study. *BMC Medicine*, 11(1), p.87.
- Cantalupo, A. et al., 2015. Nogo-B regulates endothelial sphingolipid homeostasis to control vascular

- function and blood pressure. *Nature Medicine*, 21(9), pp.1028–37.
- Cao, C. et al., 2013. Effects of IKK ϵ on Oxidised Low-density Lipoprotein-induced Injury in Vascular Endothelial Cells. *Heart, Lung and Circulation*, 22(5), pp.366–372.
- Cao, K. et al., 2014. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 67, pp.396–407.
- Cao, K. et al., 2015. Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. *Scientific Reports*, 5, p.14014.
- Carbajal, A., 2013. Composición corporal. In *Manual de Nutrición y Dietética*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, pp. 1–7.
- Careri, G. et al., 2013. Clinical Correlates and Prognostic Value of Flow Mediated Dilation in Patients With Non-ST Segment Elevation Acute Coronary Syndromes. *The American Journal of Cardiology*, 111(1), pp.51–57.
- Carey, A.L. et al., 2006. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 55(10), pp.2688–97.
- Carnevale, R. et al., 2016. Extra virgin olive oil improves post-prandial glycemic and lipid profile in patients with impaired fasting glucose. *Clinical Nutrition*, (16).
- Casino, P.R. et al., 1994. Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 23(4), pp.844–50.
- Castaner, O. et al., 2012. Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(5), pp.1238–1244.
- Castellano, J.M. et al., 2016. Free radical scavenging and α -glucosidase inhibition, two potential mechanisms involved in the anti-diabetic activity of oleanolic acid. *International Journal of Fats and Oils*, 67(3), p.142.
- Castelli, W.P. et al., 1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, 256(20), pp.2835–8.
- Di Castelnuovo, A. Di et al., 2006. Alcohol Dosing and Total Mortality in Men and Women. *Archives of Internal Medicine*, 166, pp.2437–2445.
- De Castro, S.H., Castro-Faria-Neto, H.C. & Gomes, M.B., 2005. Association of Postprandial Hyperglycemia with in Vitro LDL Oxidation in Non-Smoking Patients with Type 1 Diabetes – a Cross-Sectional Study. *The Review of Diabetic Studies*, 2(3), pp.157–157.
- Cathcart, M.K., Morel, D.W. & Chisolm, G.M., 1985. Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *Journal of Leukocyte Biology*, 38(2), pp.341–50.
- CEC, 2003. *Commission Directive 2003/94/EC: principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use*. The Commission of the European Communities, Brussels, Belgium.
- CEC, 2005. *Commission Directive 2005/26/EC, laying down principles and detailed guidelines for good*

- clinical practice as regards investigational medicinal products for human use. The Commission of the European Communities.*, Brussels, Belgium.
- CEC, 1991. *Commission Directive 91/507/EEC of 19 July 1991 modifying the Annex to Council Directive 75/318/EEC on the approximation of the laws of Member States relating to analytical, pharmacotoxicological and clinical standards and protocols in respect of the test*, Brussels, Belgium.
- CEC, 2001. *Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials.*, Brussels, Belgium.
- CEC, 2014. *EU Regulation No 536/2014 on clinical trials of medicinal products for human use. The Comission of the European Communities*, Luxembourg, Luxembourg.
- Cerdá, B. et al., 2003. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), pp.3493–501.
- Cesari, M. et al., 2003. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*, 108(19), pp.2317–22.
- Chait, A. et al., 1993. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *The American Journal of Medicine*, 94(4), pp.350–6.
- Chang, S.-H. et al., 2012. A systematic review of body fat distribution and mortality in older people. *Maturitas*, 72(3), pp.175–191.
- Charakida, M. et al., 2010. Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation. *European Heart Journal*, 31(23).
- Chaturvedi, N., 2003. Ethnic differences in cardiovascular disease. *Heart (British Cardiac Society)*, 89(6), pp.681–6.
- Chaturvedi, N. et al., 2004. Ethnic differences in vascular stiffness and relations to hypertensive target organ damage. *Journal of Hypertension*, 22(9), pp.1731–7.
- Chen et al., 2008. Tannin 1- α -O-galloylpunicalagin induces the calcium-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(10), pp.1162–71.
- Chen, H. et al., 2008. Oxidized low-density lipoproteins, autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and carotid intima media thickness in a clinically healthy population. *Cardiology*, 110(4), pp.252–9.
- Chen, M., Masaki, T. & Sawamura, T., 2002. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 95(1), pp.89–100.
- Chisolm, G.M. & Steinberg, D., 2000. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(12), pp.1815–26.
- Chiuve, S.E. et al., 2009. Intake of total trans, trans-18:1, and trans-18:2 fatty acids and risk of sudden cardiac death in women. *American Heart Journal*, 158(5), pp.761–767.

- Chobanian, A. V et al., 2003. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*, 289(19), pp.2560–72.
- Chong, M.F.-F., Macdonald, R. & Lovegrove, J.A., 2010. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *British Journal of Nutrition*, 104(Suppl 3), pp.S28–S39.
- Christian, M.S. et al., 2004. The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 27(4), pp.309–30.
- Christoph, L., Hoffmann, G. & Christoph, M., 2015. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 7(9), pp.7651–7675.
- Chrysohoou, C. et al., 2007. The association between pre-hypertension status and oxidative stress markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study. *Atherosclerosis*, 192(1), pp.169–76.
- Chudek, J. & Wiecek, A., 2006. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacological Reports*, (Suppl 58), pp.81–8.
- Church, D.F. & Pryor, W.A., 1985. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental Health Perspectives*, 64, pp.111–26.
- Ciccone, M.M. et al., 2013. Task force on: “Early markers of atherosclerosis: influence of age and sex”. *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.)*, 14(10), pp.757–66.
- Cicerale, S., Lucas, L.J. & Keast, R.S.J., 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), pp.129–35.
- Cleophas, T.J. & de Vogel, E.M., 1998. Crossover studies are a better format for comparing equivalent treatments than parallel-group studies. *Pharmacy World & Science: PWS*, 20(3), pp.113–7.
- Collins, T. & Cybulsky, M.I., 2001. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *Journal of Clinical Investigation*, 107(3), pp.255–264.
- Cominacini, L. et al., 1997. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(1–2), pp.117–27.
- Cooney, M.T. et al., 2010. Elevated resting heart rate is an independent risk factor for cardiovascular disease in healthy men and women. *American Heart Journal*, 159(4), p.612–619.e3.
- Corrado, E. et al., 2008. Endothelial dysfunction and carotid lesions are strong predictors of clinical events in patients with early stages of atherosclerosis: a 24-month follow-up study. *Coronary Artery Disease*, 19(3), pp.139–44.
- Côté, N. et al., 2010. Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis. *International Journal of Cardiology*, 145(3), pp.444–449.
- Covas, M.-I., 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*, 55(3), pp.175–86.
- Covas, M.-I. et al., 2006. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(5), pp.333–41.

- Covas, M.-I., Konstantinidou, V. & Fitó, M., 2009. Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), pp.477–82.
- Creager, M.A. et al., 1990. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *Journal of Clinical Investigation*, 86(1), pp.228–234.
- Crespo, M.C. et al., 2015. One-week administration of hydroxytyrosol to humans does not activate Phase II enzymes. *Pharmacological Research*, 95–96, pp.132–137.
- D'Angelo, S. et al., 2001. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29(11), pp.1492–8.
- Dalton, M. et al., 2003. Waist circumference, waist-hip ratio and body mass index and their correlation with cardiovascular disease risk factors in Australian adults. *Journal of Internal Medicine*, 254(6), pp.555–63.
- Damasceno, N.R.T. et al., 2011. Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21, pp.S14–S20.
- Danesh, J. et al., 2004. C-Reactive Protein and Other Circulating Markers of Inflammation in the Prediction of Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine*, 350(14), pp.1387–1397.
- Danesh, J. et al., 2008. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Medicine*, 5(4), p.e78.
- Danesh, J. et al., 2005. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*, 294(14), pp.1799–809.
- Dannefer, D., 2003. Cumulative advantage/disadvantage and the life course: cross-fertilizing age and social science theory. *The Journals of Gerontology. Series B Psychological Sciences and Social Sciences*, 58(6), pp.S327–37.
- Daray, F.M. et al., 2004. Vasoconstrictor effects of 8-iso-prostaglandin E2 and 8-iso-prostaglandin F2 α on human umbilical vein. *European Journal of Pharmacology*, 499(1–2), pp.189–95.
- Dato, S. et al., 2013. Exploring the Role of Genetic Variability and Lifestyle in Oxidative Stress Response for Healthy Aging and Longevity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), pp.16443–16472.
- Davignon, J. & Ganz, P., 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109(23 Suppl 1), p.III27–32.
- Deanfield, J.E., Halcox, J.P. & Rabelink, T.J., 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation Journal*, 115(10), pp.1285–95.
- Dedoussis, G. V. et al., 2008. Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. *Experimental and Molecular Medicine*, 40(1), p.27.
- DeFronzo, R.A. & Abdul-Ghani, M., 2011. Assessment and Treatment of Cardiovascular Risk in Prediabetes: Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *The American Journal of Cardiology*, 108(3), p.3B–24B.
- Delgado-Lista, J. et al., 2016. CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular

- PREvention study (the CORDIOPREV study): Rationale, methods, and baseline characteristics: A clinical trial comparing the efficacy of a Mediterranean diet rich in olive oil versus a low-fat diet. *American Heart Journal*, (177), pp.42–50.
- Denke, M.A., Sempos, C.T. & Grundy, S.M., 1993. Excess body weight. An underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men. *Archives of Internal Medicine*, 153(9), pp.1093–103.
- Dhana, K. et al., 2016. Body shape index in comparison with other anthropometric measures in prediction of total and cause-specific mortality. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 70(1), pp.90–96.
- Dianzani, M.U., 1992. Free radicals in physiology and pathology. *Bulletin of the Italian Society of Experimental Biology*, 68(8–9), pp.491–511.
- Dickinson, J.M., Volpi, E. & Rasmussen, B.B., 2013. Exercise and nutrition to target protein synthesis impairments in aging skeletal muscle. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 41(4), pp.216–23.
- Dimmeler, S. & Zeiher, A.M., 1999. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death and Differentiation*, 6(10), pp.964–8.
- Ding, H. et al., 2015. The method quality of cross-over studies involved in Cochrane Systematic Reviews. *PLOS ONE*, 10(4), p.e0120519.
- Dinh, Q.N. et al., 2016. Advanced atherosclerosis is associated with inflammation, vascular dysfunction and oxidative stress, but not hypertension. *Pharmacological Research*, 116, pp.70–76.
- Van Dis, I. et al., 2009. Body mass index and waist circumference predict both 10-year nonfatal and fatal cardiovascular disease risk: study conducted in 20 000 Dutch men and women aged 20–65 years. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 16(6), pp.729–734.
- Dohadwala, M.M. & Vita, J.A., 2009. Grapes and Cardiovascular Disease. *Journal of Nutrition*, 139(9), p.1788S–1793S.
- Donato, A.J. et al., 2008. Aging is associated with greater nuclear NFκB, reduced IκBα, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. *Aging Cell*, 7(6), pp.805–812.
- Dorsey, P.G. & Greenspan, P., 2014. Inhibition of Nonenzymatic Protein Glycation by Pomegranate and Other Fruit Juices. *Journal of Medicinal Food*, 17(4), pp.447–454.
- Drexler, H., 1997. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications. *Progress in Cardiovascular Disease*, 39(4), pp.287–324.
- Dvorkin, M.A. & Cardinali, D.P., 2010. *Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica* 14ª., Médica Panamericana.
- Eckel, R.H. et al., 2014. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: A report of the American College of cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*, 129(25 Suppl. 1), pp.1–46.
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. *EFSA Journal*, 9(1924), pp.1–25.
- Egashira, K., 2002. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart

- disease. *Circulation Journal*, 66(6), pp.529–33.
- Ehara, S. et al., 2001. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*, 103(15), pp.1955–60.
- Ehara, S. et al., 2008. Small coronary calcium deposits and elevated plasma levels of oxidized low density lipoprotein are characteristic of acute myocardial infarction. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 15(2), pp.75–81.
- Eilat-Adar, S. et al., 2013. Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention. *Nutrients*, 5(9), pp.3646–83.
- Elahi, M.M., Kong, Y.X. & Matata, B.M., 2009. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), pp.259–69.
- El-Bassiouni, E.A. et al., 2007. Relationship between level of circulating modified LDL and the extent of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *British Journal of Biomedical Science*, 64(3), pp.109–16.
- Ellegaard, P.K. & Poulsen, H.E., 2016. Tobacco smoking and oxidative stress to DNA: a meta-analysis of studies using chromatographic and immunological methods. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 76(2), pp.151–158.
- Elwej, A. et al., 2016. Protective effects of pomegranate peel against hematotoxicity, chromosomal aberrations, and genotoxicity induced by barium chloride in adult rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), pp.964–974.
- EMA, 2011. *Assessment report on Olea europaea L., folium*. The European Medicines Agency Science Medicines Health, London, UK.
- Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2012. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *The New England Journal of Medicine*, 367(14), pp.1310–20.
- Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2010. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *The Lancet (London, England)*, 375(9709), pp.132–40.
- Erkkilä, A.T. et al., 2005. Antibodies against oxidized LDL and cardiolipin and mortality in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 183(1), pp.157–62.
- ESC/EAS, 2016. Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*, 253, pp.281–344.
- ESC/EAS, 2011. Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*, 32(14), pp.1769–1818.
- Estruch, R. et al., 2006. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(1), pp.1–11.
- Estruch, R. et al., 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England Journal of Medicine*, 368(14), pp.1279–90.
- Everaert, B.R. et al., 2010. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway. *International Journal*

- of Cardiology*, 144(3), pp.350–66.
- Expert Committee, 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*, 20(7), pp.1183–97.
- Von Eynatten, M. et al., 2007. Atherogenic dyslipidaemia but not total- and high-molecular weight adiponectin are associated with the prognostic outcome in patients with coronary heart disease. *European Heart Journal*, 29(10), pp.1307–1315.
- Fabian, E., Bogner, M. & Elmadfa, I., 2012. Age-related modification of antioxidant enzyme activities in relation to cardiovascular risk factors. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(1), pp.42–48.
- Falk, E., 2006. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), pp.C7–C12.
- Farhat, N. et al., 2008. Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(11), pp.761–769.
- Faviou, E. et al., 2005. Circulating oxidized low density lipoprotein, autoantibodies against them and homocysteine serum levels in diagnosis and estimation of severity of coronary artery disease. *Free Radical Research*, 39(4), pp.419–29.
- Favre, D. et al., 2011. Role for inducible cAMP early repressor in promoting pancreatic beta cell dysfunction evoked by oxidative stress in human and rat islets. *Diabetologia*, 54(9), pp.2337–2346.
- FDA, 2003. *Code of Federal Regulations. Title 21-Food and Drugs. Subpart A-General Provisions by the Food and Drug Administration*, Maryland, U.S.A.
- FDA, 2016. GRAS Notices by the Food and Drug Administration. *U.S. Department of Health & Human Services*. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=HYDROXYTYROSOL [Accessed December 21, 2016].
- Fenercioglu, A.K. et al., 2010. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of Endocrinological Investigation*, 33(2), pp.118–24.
- Fernández, G.C. et al., 2003. Fisiopatología de la placa de ateroma y sus implicaciones en la imagen. *Radiología*, 45(3), pp.107–114.
- Fernández-Pachón, M.S. et al., 2005. Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), pp.5024–9.
- Fernández-Sánchez, A. et al., 2011. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), pp.3117–3132.
- FESNAD-SEEDO, 2011. Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos (Consenso FESNAD-SEEDO). *Revista Española de Obesidad*, 10(1).
- Fibrinogen Studies Collaboration et al., 2005. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis.

- JAMA*, 294(14), pp.1799–809.
- de Figueiredo, S.M. et al., 2013. The anti-oxidant properties of isothiocyanates: a review. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 7(3), pp.213–25.
- Fitó, M. et al., 2005. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181(1), pp.149–158.
- Fki, I., Sahnoun, Z. & Sayadi, S., 2007. Hypocholesterolemic Effects of Phenolic Extracts and Purified Hydroxytyrosol Recovered from Olive Mill Wastewater in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), pp.624–631.
- Flint, A.J. et al., 2010. Excess Weight and the Risk of Incident Coronary Heart Disease Among Men and Women. *Obesity*, 18(2), pp.377–383.
- Folsom, A.R. et al., 2006. An assessment of incremental coronary risk prediction using C-reactive protein and other novel risk markers: the atherosclerosis risk in communities study. *Archives of Internal Medicine*, 166(13), pp.1368–73.
- Fox, K. et al., 2007. Resting heart rate in cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(9), pp.823–30.
- Franklin, S.S. et al., 1997. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. *Circulation*, 96(1).
- Freeman, B.A. & Crapo, J.D., 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), pp.412–26.
- Friguet, B., 2002. Protein Repair and Degradation during Aging. *The Scientific World Journal*, 2, pp.248–254.
- Frostegård, J. et al., 2003. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 105(5), pp.615–20.
- Frost-Pineda, K. et al., 2011. Biomarkers of Potential Harm Among Adult Smokers and Nonsmokers in the Total Exposure Study. *Nicotine & Tobacco Research*, 13(3), pp.182–193.
- Fuhrman, B., Volkova, N. & Aviram, M., 2005. Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), pp.570–6.
- Fuhrman, B., Volkova, N. & Aviram, M., 2010. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: Studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition*, 26(4), pp.359–366.
- Galis, Z.S. et al., 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*, 94(6), pp.2493–2503.
- Gao, L. et al., 2012. Effects of coenzyme Q10 on vascular endothelial function in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*, 221(2), pp.311–6.
- Gao, P., Lu, T. & Si, L.-Y., 2016. Triglycerides are Independently Associated with Atherosclerosis in Elderly Chinese Patients. *Clinical Laboratory*, 62(5), pp.939–45.
- Garrison, R.J. et al., 1980. Obesity and lipoprotein cholesterol in the Framingham offspring study. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 29(11), pp.1053–60.

- GBD Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 385(9963), pp.117–71.
- GBD Mortality and Causes of Death Collaborators, 2016. Global, regional, and national life expectancy, all cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980 – 2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), pp.1459–154.
- Genuth, S. et al., 2003. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26(11), pp.3160–7.
- Georgakouli, K. et al., 2016. The Effects of an Olive Fruit Polyphenol-Enriched Yogurt on Body Composition, Blood Redox Status, Physiological and Metabolic Parameters and Yogurt Microflora. *Nutrients*, 8(6).
- George, J. et al., 1999. Anti-oxidized low density lipoprotein antibody determination as a predictor of restenosis following percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Immunology Letters*, 68(2–3), pp.263–6.
- Giannotti, G. et al., 2010. Impaired Endothelial Repair Capacity of Early Endothelial Progenitor Cells in Prehypertension: Relation to Endothelial Dysfunction. *Hypertension*, 55(6), pp.1389–1397.
- Gil, M.I. et al., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), pp.4581–9.
- Gimbrone, M.A. et al., 2000. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 902, pp.230-9-40.
- Giordano, E., Dávalos, A. & Visioli, F., 2014. Chronic hydroxytyrosol feeding modulates glutathione-mediated oxido-reduction pathways in adipose tissue: a nutrigenomic study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 24(10), pp.1144–50.
- Gokulakrishnan, K. et al., 2007. Oxidized low-density lipoprotein and intimal medial thickness in subjects with glucose intolerance: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study-25. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 56(2), pp.245–50.
- Gong, D. et al., 2009. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytotherapy Research: PTR*, 23(5), pp.646–50.
- Gonzalez, M. et al., 1992. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Medical Plant*, 58(6), pp.513–5.
- González-Diego, P. et al., 2009. Adaptation of the Framingham-Wilson coronary risk equation for the population of Navarra (RICORNA). *Spanish Journal of Cardiology*, 62(8), pp.875–85.
- González-Ortiz, M. et al., 2011. Effect of pomegranate juice on insulin secretion and sensitivity in patients with obesity. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 58(3), pp.220–3.
- Gorinstein, S. et al., 2002. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), pp.6102–8.
- Goszcz, K. et al., 2017. Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *British Journal of Pharmacology*.

- Gould, A.L. et al., 2007. Cholesterol reduction yields clinical benefits: meta-analysis including recent trials. *Clinical Therapeutics*, 29(5), pp.778–94.
- Gracia-Marco, L. et al., 2016. Body Composition Indices and Single and Clustered Cardiovascular Disease Risk Factors in Adolescents: Providing Clinical-Based Cut-Points. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 58(5), pp.555–564.
- Gradinaru, D. et al., 2015. Oxidized LDL and NO synthesis- Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 151, pp.101–13.
- Graessler, J. et al., 2007. Glycooxidised LDL isolated from subjects with impaired glucose tolerance increases CD36 and peroxisome proliferator-activator receptor γ gene expression in macrophages. *Diabetologia*, 50(5), pp.1080–1088.
- Gräfe, M. et al., 1998. Human cardiac microvascular and macrovascular endothelial cells respond differently to oxidatively modified LDL. *Atherosclerosis*, 137(1), pp.87–95.
- Graham, I. et al., 2007. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology (ESC) and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *European Heart Journal*, 28, pp.2375–2414.
- Graham, I. et al., 2007. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology (ESC) and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, 14(Suppl 2), pp.E1-40.
- Granados-Principal, S. et al., 2010. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*, 68(4), pp.191–206.
- Grassi, D. et al., 2010. Oxidative stress and endothelial dysfunction: say NO to cigarette smoking! *Current Pharmaceutical Design*, 16(23), pp.2539–50.
- Green, D. et al., 2009. Elevated fibrinogen levels and subsequent subclinical atherosclerosis: the CARDIA Study. *Atherosclerosis*, 202(2), pp.623–31.
- Guasch-Ferré, M. et al., 2014. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine*, 12, p.78.
- Van Guilder, G.P. et al., 2005. Endothelial t-PA release is impaired in overweight and obese adults but can be improved with regular aerobic exercise. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 289(5), pp.E807–E813.
- Guo, R. & Ren, J., 2010. Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), pp.1285–301.
- Guo, X. et al., 2013. Association between pre-hypertension and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Current Hypertension Reports*, 15(6), pp.703–16.
- Guo, X. et al., 2016. Effects of Polyphenol, Measured by a Biomarker of Total Polyphenols in Urine, on Cardiovascular Risk Factors After a Long-Term Follow-Up in the PREDIMED Study.

- Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(2572606), pp.1–11.
- Guralnik, J.M. & Kaplan, G.A., 1989. Predictors of healthy aging: prospective evidence from the Alameda County study. *American Journal of Public Health*, 79(6), pp.703–8.
- Gutiérrez, E. et al., 2013. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *European Heart Journal*, 34(41), pp.3175–81.
- Guxens, M. et al., 2009. Hypertensive status and lipoprotein oxidation in an elderly population at high cardiovascular risk. *American Journal of Hypertension*, 22(1), pp.68–73.
- Guzik, T.J. et al., 2002. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 105(14), pp.1656–62.
- Hamilton, J.A. et al., 1999. Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(1), pp.98–105.
- Hamilton, S.J. & Watts, G.F., 2013. Atherogenic Dyslipidemia and Combination Pharmacotherapy in Diabetes: Recent Clinical Trials. *The Review of Diabetic Studies*, 10(2–3), pp.191–203.
- Hamoud, S. et al., 2014. Pomegranate extract (POMx) decreases the atherogenicity of serum and of human monocyte-derived macrophages (HMDM) in simvastatin-treated hypercholesterolemic patients: A double-blinded, placebo-controlled, randomized, prospective pilot study. *Atherosclerosis*, 232(1), pp.204–210.
- Handelsman, Y. & Shapiro, M.D., 2017. Triglycerides, atherosclerosis, and cardiovascular outcome studies: focus on omega-3 fatty acids. *Endocrine Practice*, 23(1), pp.100–112.
- Hanna-Moussa, A. et al., 2009. Dysglycemia/prediabetes and cardiovascular risk factors. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 10(4), pp.202–8.
- Hansson, G.K., 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 352(16), pp.1685–95.
- Hardwick, S.J. et al., 1996. Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *Journal of Pathology*, 179(3), pp.294–302.
- Harman, D., 1981. The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), pp.7124–8.
- Harmon, M.E. et al., 2016. Associations of Circulating Oxidized LDL and Conventional Biomarkers of Cardiovascular Disease in a Cross-Sectional Study of the Navajo Population H. Itabe, ed. *PLOS ONE*, 11(3), p.e0143102.
- Harris, R.A., Trudell, J.R. & Mihic, S.J., 2008. Ethanol's molecular targets. *Science Signaling*, 1(28), p.re7.
- Hartman, J. & Frishman, W.H., 2014. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiology in Review*, 22(3), pp.147–51.
- Hartz, A.J. et al., 1983. Relationship of obesity to diabetes: influence of obesity level and body fat distribution. *Preventive Medicine*, 12(2), pp.351–7.
- Harvard Medical School, 2005. *Family Health Guide*, California, U.S.A: Simon and Schuster.

- Hashimoto, M. et al., 1991. Age-related increase in the uptake of acetylated low density lipoprotein into cultured endothelial cells from rat aorta. *Experimental Gerontology*, 26(4), pp.397–406.
- Hayashi, T. et al., 2004. Visceral adiposity is an independent predictor of incident hypertension in Japanese Americans. *Annals of Internal Medicine*, 140(12), pp.992–1000.
- He, F.J. & MacGregor, G.A., 2009. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of Human Hypertension*, 23(6), pp.363–84.
- He, L. -p. et al., 2010. Early C-reactive protein in the prediction of long-term outcomes after acute coronary syndromes: a meta-analysis of longitudinal studies. *Heart*, 96(5), pp.339–346.
- Heber, D. et al., 2007. Safety and Antioxidant Activity of a Pomegranate Ellagitannin-Enriched Polyphenol Dietary Supplement in Overweight Individuals with Increased Waist Size. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), pp.10050–10054.
- Heeschen, C. et al., 2004. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*, 109(13), pp.1615–22.
- Heiss, C. et al., 2005. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(7), pp.1276–83.
- Heitzer, T. et al., 1996. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation*, 93(7), pp.1346–53.
- Hernaiz, A. et al., 2015. Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *Journal of Nutrition*, 145(8), pp.1692–1697.
- Hernández, Á. et al., 2015. Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *The Journal of Nutrition*, 145(8), pp.1692–7.
- Herrera, M.D. et al., 2010. Endothelial dysfunction and aging: An update. *Ageing Research Reviews*, 9(2), pp.142–152.
- Herrick, S. et al., 1999. Fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(7), pp.741–6.
- Higashi, Y. et al., 2006. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. *Atherosclerosis*, 186(2), pp.390–5.
- Hirase, T. & Node, K., 2012. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 302(3), pp.H499-505.
- Hisamatsu, T. et al., 2014. High long-chain n-3 fatty acid intake attenuates the effect of high resting heart rate on cardiovascular mortality risk: A 24-year follow-up of Japanese general population. *Journal of Cardiology*, 64(3), pp.218–224.
- Höhn, A. et al., 2017. Happily never after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, 11, pp.482–501.
- Hollebeeck, S. et al., 2012. Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food & Function*, 3(8), pp.875–85.

- Holvoet, P. et al., 2003. Association of High Coronary Heart Disease Risk Status With Circulating Oxidized LDL in the Well-Functioning Elderly: Findings From the Health, Aging, and Body Composition Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(8), pp.1444–1448.
- Holvoet, P. et al., 2001. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(5), pp.844–8.
- Holvoet, P. et al., 2004. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes*, 53(4), pp.1068–73.
- Holvoet, P. et al., 2007. The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*, 194(1), pp.245–52.
- Hoogeveen, R.C. et al., 2007. Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetologia*, 50(1), pp.36–42.
- Hosseini, B. et al., 2016. Effects of pomegranate extract supplementation on inflammation in overweight and obese individuals: A randomized controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 22, pp.44–50.
- Hu, F.B. et al., 2001. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. *Archives of Internal Medicine*, 161(14), pp.1717–23.
- Hu, G. et al., 2007. Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist-Hip Ratio on the Risk of Total and Type-Specific Stroke. *Archives of Internal Medicine*, 167(13), p.1420.
- Hu, T. et al., 2014. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), pp.1449–55.
- Huang, H. et al., 2016. Effects of Berries Consumption on Cardiovascular Risk Factors: A Meta-analysis with Trial Sequential Analysis of Randomized Controlled Trials. *Scientific Reports*, 6, p.23625.
- Huang, H. et al., 2012. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol and the ratio in the diagnosis and evaluation of therapeutic effect in patients with coronary artery disease. *Disease Markers*, 33(6), pp.295–302.
- Huang, H. et al., 2008. The oxidation ratio of LDL: a predictor for coronary artery disease. *Disease Markers*, 24(6), pp.341–9.
- Huang, T.H.W. et al., 2005. Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), pp.160–9.
- Huang, Y. et al., 2014. Association of all-cause and cardiovascular mortality with prehypertension: a meta-analysis. *American Heart Journal*, 167(2), p.160–168.e1.
- Huang, Y. et al., 2013. Prehypertension and incidence of cardiovascular disease: a meta-analysis. *BMC Medicine*, 11, p.177.
- Huby, A.-C. et al., 2015. Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis clinical perspective.

- Circulation*, 132(22), pp.2134–2145.
- Hulthe, J. & Fagerberg, B., 2002. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(7), pp.1162–7.
- Hulthe, J., Hultén, L.M. & Fagerberg, B., 2003. Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 52(12), pp.1612–4.
- Hunt, K.J. et al., 2013. Oxidized LDL and AGE-LDL in circulating immune complexes strongly predict progression of carotid artery IMT in type 1 diabetes. *Atherosclerosis*, 231(2), pp.315–322.
- Hunter, J.E., Zhang, J. & Kris-Etherton, P.M., 2010. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(1), pp.46–63.
- Huo, Y. & Ley, K.F., 2004. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(1), pp.18–22.
- Hwang, S.J. et al., 1997. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*, 96(12), pp.4219–25.
- Hwang, Y.-C. et al., 2016. Increased Visceral Adipose Tissue Is an Independent Predictor for Future Development of Atherogenic Dyslipidemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(2), pp.678–685.
- Iaccarino, G. et al., 2004. AKT Participates in Endothelial Dysfunction in Hypertension. *Circulation*, 109(21), pp.2587–2593.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996. *Guideline for good clinical practice E6(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland.
- IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2012. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *The Lancet (London, England)*, 379(9822), pp.1205–13.
- Im, T.S. et al., 2014. Grade-response relationship between blood pressure and severity of coronary atherosclerosis in asymptomatic adults: assessment with coronary CT angiography. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, 30 Suppl 2, pp.105–12.
- Inaba, Y., Chen, J.A. & Bergmann, S.R., 2010. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, 26(6), pp.631–40.
- Indulekha, K. et al., 2011. Association of visceral and subcutaneous fat with glucose intolerance, insulin resistance, adipocytokines and inflammatory markers in Asian Indians (CURES-113). *Clinical Biochemistry*, 44(4), pp.281–7.
- INE, 2016. *Defunciones según la Causa de Muerte Año 2014*. El Instituto Nacional de Estadística, Madrid, España.

- Ingelsson, E. et al., 2008. Altered blood pressure progression in the community and its relation to clinical events. *Archives of Internal Medicine*, 168(13), pp.1450–7.
- Inoue, T. & Node, K., 2006. Vascular failure: A new clinical entity for vascular disease. *Journal of Hypertension*, 24(11), pp.2121–30.
- Isaacs, A. et al., 2013. Risk Scores of Common Genetic Variants for Lipid Levels Influence Atherosclerosis and Incident Coronary Heart Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(9), pp.2233–2239.
- Itabe, H., 2003. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(1), pp.1–9.
- Ito, H. et al., 2014. Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products. *Food Chemistry*, 152, pp.323–330.
- James, P.A. et al., 2014. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*, 311(5), pp.507–20.
- Jankovic, N. et al., 2014. Adherence to a healthy diet according to the World Health Organization guidelines and all-cause mortality in elderly adults from Europe and the United States. *American Journal of Epidemiology*, 180(10), pp.978–88.
- Jay, D., Hitomi, H. & Griendling, K.K., 2006. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(2), pp.183–92.
- Jemai, H. et al., 2008. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2–3), pp.88–98.
- Jhamnani, S. et al., 2015. Meta-Analysis of the Effects of Lifestyle Modifications on Coronary and Carotid Atherosclerotic Burden. *The American Journal of Cardiology*, 115(2), pp.268–275.
- Jiménez, M.C. et al., 2015. Association Between High-Sensitivity C-Reactive Protein and Total Stroke by Hypertensive Status Among Men. *Journal of the American Heart Association*, 4(9), p.e002073.
- Jiménez, M.C. et al., 2016. Association Between Markers of Inflammation and Total Stroke by Hypertensive Status Among Women. *American Journal of Hypertension*, 29(9), pp.1117–24.
- Jimi, S. et al., 1995. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 116(1), pp.15–26.
- Johnston, N. et al., 2006a. Improved identification of patients with coronary artery disease by the use of new lipid and lipoprotein biomarkers. *The American Journal of Cardiology*, 97(5), pp.640–5.
- Johnston, N. et al., 2006b. Oxidized low-density lipoprotein as a predictor of outcome in patients with unstable coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*, 113(2), pp.167–173.
- Jorde, U.P. et al., 2007. Exercise-induced increases in oxidized low-density lipoprotein are associated with adverse outcomes in chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, 13(9), pp.759–64.
- Joshiyura, K.J. et al., 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA*,

- 282(13), pp.1233–9.
- Joshiyura, K.J. et al., 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*, 134(12), pp.1106–14.
- Kalra, L. et al., 2005. Ethnic differences in arterial responses and inflammatory markers in Afro-Caribbean and Caucasian subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(11).
- Kamanna, V.S. et al., 1999. Oxidized low-density lipoprotein stimulates monocyte adhesion to glomerular endothelial cells. *Kidney International*, 55(6), pp.2192–202.
- Kamceva, G. et al., 2016. Cigarette Smoking and Oxidative Stress in Patients with Coronary Artery Disease. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(4), p.636.
- Kamiyama, M. et al., 2009. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by Nagano purple grape (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 55(6), pp.471–8.
- Kampus, P. et al., 2007. Augmentation index and carotid intima-media thickness are differently related to age, C-reactive protein and oxidized low-density lipoprotein. *Journal Hypertension*, 25(4), pp.819–25.
- Kannel, W.B. et al., 1961. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*, 55, pp.33–50.
- Kaplan, M. et al., 2001. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, 131(8), pp.2082–9.
- Kaplan, M. & Aviram, M., 1999. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 37(8), pp.777–87.
- Kaptoge, S. et al., 2007. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies. *American Journal of Epidemiology*, 166(8), pp.867–79.
- Kaptoge, S. et al., 2014. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *European Heart Journal*, 35(9), pp.578–89.
- Kar, K. & Wright, J., 2014. Probing the mechanisms underlying the mitigation of cognitive aging with anodal transcranial direct current stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 111(7), pp.1397–1399.
- Kara, C. et al., 2008. The effects of metabolic control on oxidized low-density lipoprotein antibodies in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*, 9(1), pp.17–22.
- Karas, M.G. et al., 2016. Measures of Body Size and Composition and Risk of Incident Atrial Fibrillation in Older People. *American Journal of Epidemiology*, 183(11), pp.998–1007.
- Karastergiou, K. & Fried, S.K., 2013. Multiple adipose depots increase cardiovascular risk via local and systemic effects. *Current Atherosclerosis Reports*, 15(10), p.361.
- Karasu, Ç., 2010. Glycoxidative Stress and Cardiovascular Complications in Experimentally-Induced

- Diabetes: Effects of Antioxidant Treatment. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4(1), pp.240–256.
- Karatzi, K. et al., 2007. Acute smoke-induced endothelial dysfunction is more prolonged in smokers than in non-smokers. *International Journal of Cardiology*, 120(3), pp.404–406.
- Karatzis, E.N. et al., 2006. Long-Term Prognostic Role of Flow-Mediated Dilatation of the Brachial Artery After Acute Coronary Syndromes Without ST Elevation. *The American Journal of Cardiology*, 98(11), pp.1424–1428.
- Kassi, E. et al., 2009. Circulating oxidized LDL levels, current smoking and obesity in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 205(1), pp.279–283.
- Katan, M.B., 2000. Trans fatty acids and plasma lipoproteins. *Nutrition Reviews*, 58(6), pp.188–91.
- Katusic, Z.S., 2007. Mechanisms of Endothelial Dysfunction Induced by Aging: Role of Arginase I. *Circulation Research*, 101(7), pp.640–641.
- Katz, S., 2000. Busy bodies: Activity, Aging, and the Management of Everyday Life. *Journal of Aging Studies*, 14(2), pp.135–152.
- Kawakami, K. et al., 2014. Inhibitory Effects of Pomegranate Extracts on Recombinant Human Maltase-Glucoamylase. *Journal of Food Science*, 79(9), pp.H1848–H1853.
- Kazemi-Bajestani, S.M. et al., 2015. Serum high sensitivity CRP concentrations predict the presence of carotid artery plaque in individuals without a history of cardiovascular events. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 25(4), pp.434–5.
- Kelishadi, R. et al., 2011. Acute and long term effects of grape and pomegranate juice consumption on endothelial dysfunction in pediatric metabolic syndrome. *Journal of Research in Medical Sciences: the Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 16(3), pp.245–53.
- Kelly, A.S. et al., 2010. Relation of Circulating Oxidized LDL to Obesity and Insulin Resistance in Children. *Pediatric Diabetes*, 11(8), pp.552–555.
- Kerr, R., Stirling, D. & Ludlam, C.A., 2001. Interleukin 6 and haemostasis. *British Journal of Haematology*, 115(1), pp.3–12.
- Khaleghi, M. et al., 2008. Association of Soluble Cell Adhesion Molecules with Ankle-Brachial Index in a Biethnic Cohort of Predominantly Hypertensive Individuals. *Clinical Chemistry*, 54(11), pp.1788–1795.
- Khan, N. et al., 2014. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, 6(2), pp.844–80.
- Khot, U.N., 2003. Prevalence of Conventional Risk Factors in Patients With Coronary Heart Disease. *JAMA*, 290(7), p.898.
- Khrapko, K. & Turnbull, D., 2014. Mitochondrial DNA Mutations in Aging. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. pp. 29–62.
- Kiechl, S. et al., 2007. Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and 10-year cardiovascular outcomes: prospective results from the Bruneck study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), pp.1788–95.
- Kim, J.-H., Bachmann, R.A. & Chen, J., 2009. Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitamins and Hormones*, 80, pp.613–33.

- Kim, M. et al., 2013. Increased oxidative stress in normal-weight postmenopausal women with metabolic syndrome compared with metabolically healthy overweight/obese individuals. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 62(4), pp.554–560.
- Kim, O.Y. et al., 2013. Follow-ups of metabolic, inflammatory and oxidative stress markers, and brachial-ankle pulse wave velocity in middle-aged subjects without metabolic syndrome. *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y. : 1993)*, 35(5), pp.382–8.
- Kinlay, S., Libby, P. & Ganz, P., 2001. Endothelial function and coronary artery disease. *Current Opinion in Lipidology*, 12(4), pp.383–9.
- Kirkland, D. et al., 2015. Investigations into the genotoxic potential of olive extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777, pp.17–28.
- Kissel, C.K. & Anderson, T.J., 2012. Role of Endothelin-1 and Endothelial Dysfunction in Prehypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 28(3), pp.251–253.
- Kloner, R.A. & Rezkalla, S.H., 2007. To drink or not to drink? That is the question. *Circulation*, 116(11), pp.1306–1317.
- Knudson, J.D., Dick, G.M. & Tune, J.D., 2007. Adipokines and coronary vasomotor dysfunction. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 232(6), pp.727–36.
- Kocijancic, M. et al., 2016. Soluble intracellular adhesion molecule-1 and omentin-1 as potential biomarkers of subclinical atherosclerosis in hemodialysis patients. *International Urology and Nephrology*, 48(7), pp.1145–1154.
- Koenig, W. et al., 1999. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study. *Circulation*, 99(2), pp.237–42.
- Koenig, W. et al., 2011. Oxidized LDL and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *Clinical Chemistry*, 57(8), pp.1196–200.
- Kohno, M. et al., 1998. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation*, 98(4), pp.353–9.
- Komaki, E. et al., 2003. Identification of anti- α -amylase components from oliveleaf extracts. *Food Science and Technology Research*, 9(1), pp.35–39.
- De Koning, L. et al., 2007. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *European Heart Journal*, 28(7), pp.850–856.
- Konstantinidou, V. et al., 2010. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *The FASEB Journal*, 24(7), pp.2546–2557.
- Kopprasch, S. et al., 2002. In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes*, 51(10), pp.3102–6.
- Kopprasch, S. et al., 2003. Lack of Association between Serum Paraoxonase 1 Activities and Increased Oxidized Low-Density Lipoprotein Levels in Impaired Glucose Tolerance and Newly

- Diagnosed Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(4), pp.1711–1716.
- Kotseva, K. et al., 2010. EUROASPIRE III. Management of cardiovascular risk factors in asymptomatic high-risk patients in general practice: cross-sectional survey in 12 European countries. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, 17(5), pp.530–40.
- Koubaa, N. et al., 2007. Hyperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: role of genetic and dietary factors. *Clinical Biochemistry*, 40(13–14), pp.1007–14.
- Kougialis, S. et al., 2010. Atorvastatin therapy is associated with improvement of oxidized low-density lipoprotein cholesterol levels, which correlates with the degree of stenosis in patients with carotid atheromatosis with and without prior angioplasty. *International Angiology: a Journal of the International Union of Angiology*, 29(4), pp.338–47.
- Krintus, M. et al., 2014. Critical appraisal of inflammatory markers in cardiovascular risk stratification. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 51(5), pp.263–79.
- Kris-Etherton, P.M. et al., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, p.71S–88S.
- Krzeminski, R. et al., 2003. Effect of different olive oils on bile excretion in rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), pp.5774–9.
- Kulkarni, A.P. et al., 2007. In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), pp.1491–500.
- Kuller, L.H. et al., 1996. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *American Journal of Epidemiology*, 144(6), pp.537–47.
- Kumagai, Y. et al., 2015. Anti-Glycation Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Extract and Its Components in Vivo and in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), pp.7760–7764.
- Kumar, A. & Singh, V., 2010. Atherogenic dyslipidemia and diabetes mellitus: what's new in the management arena? *Vascular Health and Risk Management*, 6, pp.665–9.
- Kume, N. et al., 1998. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circulation Research*, 83(3), pp.322–7.
- Kunjathoor, V. V et al., 2002. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51), pp.49982–8.
- Kurth, T. et al., 2005. Prospective Study of Body Mass Index and Risk of Stroke in Apparently Healthy Women. *Circulation*, 111(15), pp.1992–1998.
- Kuvin, J.T. et al., 2001. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(7), pp.1843–9.
- De la Torre-Robles, A. et al., 2014. Estimation of the intake of phenol compounds from virgin olive

- oil of a population from southern Spain. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 31(9), pp.1460–9.
- Lahoz, C. & Mostaza, J.M., 2007. Atherosclerosis as a systemic disease. *Spanish Journal of Cardiology*, 60(2), pp.184–195.
- Lama, A. et al., 2016. Polyphenol-rich virgin olive oil reduces insulin resistance and liver inflammation and improves mitochondrial dysfunction in high fat diet fed rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(3).
- Lamar, M. et al., 2012. Differential associations between types of verbal memory and prefrontal brain structure in healthy aging and late life depression. *Neuropsychologia*, 50(8), pp.1823–1829.
- Langsted, A. et al., 2011. Nonfasting cholesterol and triglycerides and association with risk of myocardial infarction and total mortality: the Copenhagen City Heart Study with 31 years of follow-up. *Journal of Internal Medicine*, 270(1), pp.65–75.
- Lau, K.-K. et al., 2008. Incremental predictive value of vascular assessments combined with the Framingham Risk Score for prediction of coronary events in subjects of low-intermediate risk. *Postgraduate Medical Journal*, 84(989), pp.153–7.
- Lautamäki, R. et al., 2007. Low serum adiponectin is associated with high circulating oxidized low-density lipoprotein in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 56(7), pp.881–6.
- Lavi, S. et al., 2007. Smoking is associated with epicardial coronary endothelial dysfunction and elevated white blood cell count in patients with chest pain and early coronary artery disease. *Circulation*, 115(20), pp.2621–7.
- Le, J.M. & Vilcek, J., 1989. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 61(6), pp.588–602.
- Le, N.-A., 2014. Lipoprotein-associated oxidative stress: a new twist to the postprandial hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), pp.401–19.
- Lebrero, E.A. et al., 2015. *Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on the conditions of use of certain substances to be used in food supplements*, Madrid, Spain.
- Lee, J.D. et al., 2017. The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *Journal of Women's Health*, p.jwh.2016.5973.
- Lehmann, N. et al., 2016. Accelerated progression of coronary artery calcification in hypertension but also prehypertension. *Journal of Hypertension*, 34(11), pp.2233–42.
- Lei, F. et al., 2007. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International Journal of Obesity*, 31(6), pp.1023–9.
- Levick, J.R., 2003. *An introduction to cardiovascular physiology* 4^a, London, UK: Oxford University Press.
- Lewington, S. et al., 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *The Lancet*,

- 360(9349), pp.1903–1913.
- Li et al., 1998. Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by reducing P-selectin synthesis in vitro. *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research*, 6(1), pp.1–8.
- Li et al., 2015. Sulforaphane protected the injury of human vascular endothelial cell induced by LPC through up-regulating endogenous antioxidants and phase II enzymes. *Food Funct.*, 6(6), pp.1984–1991.
- Li, D. & Mehta, J.L., 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect against oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research*, 10(1), pp.17–21.
- Li, D. & Mehta, J.L., 2000. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 101(25), pp.2889–95.
- Li, D.-W. et al., 2012. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 30(5), pp.1000–6.
- Li, G. et al., 2015. The anti-infective activity of punicalagin against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium in mice. *Food & Function*, 6(7), pp.2357–64.
- Li, S.-H. et al., 2013. The acute effects of grape polyphenols supplementation on endothelial function in adults: meta-analyses of controlled trials. *PLOS ONE*, 8(7), p.e69818.
- Li, Y., 2015. Association between resting heart rate and cardiovascular mortality: evidence from a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(9), pp.15329–39.
- Li, Z., Liu, B. & Wei, Y., 1998. Effect of Ox-LDL on cell cycling phases and PCNA, P53, P27 and c-erbB-2 expression in cultured human arterial smooth muscle cells. *Hua xi yi ke da xue xue bao= Journal of West China University of Medical Sciences*, 29(4), pp.394–8.
- Liao, J.K. et al., 1995. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(1), pp.319–24.
- Libby, P., 2012. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), pp.2045–51.
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), pp.868–74.
- Libby, P. et al., 2010. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 74(2), pp.213–20.
- Libby, P. et al., 1996. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Current Opinion in Lipidology*, 7(5), pp.330–5.
- Libby, P., 1995. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91(11), pp.2844–50.
- Libby, P., Ridker, P.M. & Hansson, G.K., 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), pp.317–25.
- Lim, S. & Meigs, J., 2013. Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. *International Journal of Cardiology*, 169(3), pp.166–176.
- Lin, R.-Y. et al., 2003. Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-

- deficient mice. *Atherosclerosis*, 168(2), pp.213–20.
- Lin, R.-Y. et al., 2002. Lowering of dietary advanced glycation endproducts (AGE) reduces neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*, 163(2), pp.303–11.
- Lindner, V. et al., 1991. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circulation Research*, 68(1), pp.106–13.
- Liu, J. et al., 2013. Effects of blood triglycerides on cardiovascular and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of 61 prospective studies. *Lipids in Health and Disease*, 12, p.159.
- Liu, P. et al., 2013. The utility of fat mass index vs. body mass index and percentage of body fat in the screening of metabolic syndrome. *BMC Public Health*, 13(1), p.629.
- Liu, S. et al., 2000. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(4), pp.922–8.
- Liu, W. et al., 2014. Pomegranate phenolics inhibit formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyl species. *Food & Function*, 5(11), pp.2996–3004.
- Liu, W., Morrow, J.D. & Yin, H., 2009. Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(8), pp.1101–7.
- Livingstone, M.B.E. & Black, A.E., 2003. Markers of the validity of reported energy intake. *The Journal of Nutrition*, p.895S–920S.
- Lobos, J.M. et al., 2008. European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice: CEIPC 2008 Spanish Adaptation. *Spanish Journal of Public Health*, 82(6), pp.581–616.
- Lockyer, S. et al., 2016. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *European Journal of Nutrition*.
- Lockyer, S. et al., 2015. Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *The British Journal of Nutrition*, 114(1), pp.75–83.
- Loidl, A. et al., 2004. Role of ceramide in activation of stress-associated MAP kinases by minimally modified LDL in vascular smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1690(2), pp.150–158.
- Lönn, M.E., Dennis, J.M. & Stocker, R., 2012. Actions of antioxidants in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), pp.863–84.
- Lopes-Virella, M.F. et al., 2011. Levels of Oxidized LDL and Advanced Glycation End Products-Modified LDL in Circulating Immune Complexes Are Strongly Associated With Increased Levels of Carotid Intima-Media Thickness and Its Progression in Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 60(2), pp.582–589.
- López-Villodres, J.A. et al., 2016. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 37, pp.94–100.
- Lotufo, P.A. et al., 2001. Diabetes and all-cause and coronary heart disease mortality among US male physicians. *Archives of Internal Medicine*, 161(2), pp.242–7.

- Luc, G., 2003. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Fibrinogen as Predictors of Coronary Heart Disease: The PRIME Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(7), pp.1255–1261.
- de Lucia, C., Murphy, T. & Thuret, S., 2017. Emerging Molecular Pathways Governing Dietary Regulation of Neural Stem Cells during Aging. *Frontiers in Physiology*, 8, p.17.
- Lykkesfeldt, J. et al., 1997. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress caused by smoking. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(4), pp.959–63.
- Ma, F.X. et al., 2006. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Lipid Research*, 47(6), pp.1227–37.
- Maas, R. et al., 2008. Simultaneous Assessment of Endothelial Function, Nitric Oxide Synthase Activity, Nitric Oxide-Mediated Signaling, and Oxidative Stress in Individuals with and without Hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry*, 54(2), pp.292–300.
- Mahmud, A. & Feely, J., 2002. Divergent effect of acute and chronic alcohol on arterial stiffness. *American Journal of Hypertension*, 15(3), pp.240–243.
- Mahmud, A. & Feely, J., 2003. Effect of Smoking on Arterial Stiffness and Pulse Pressure Amplification. *Hypertension*, 41(1).
- Maiolino, G. et al., 2013. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators of Inflammation*, pp.1–13.
- Makino-Wakagi, Y. et al., 2012. Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(2), pp.880–5.
- Mancia, G. et al., 2013. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 34(28), pp.2159–2219.
- Mancia, G. et al., 2013. Guía práctica clínica de la ESH/ESC para el manejo de la hipertensión arterial (2013). *Hipertensión y Riesgo Cardiovascular*, 30(3), pp.1–94.
- MAPAMA, 2016. *Informe del consumo de alimentación en España. El Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente*, Madrid, España.
- De Marco, M. et al., 2009. Cardiovascular and metabolic predictors of progression of prehypertension into hypertension: the Strong Heart Study. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 54(5), pp.974–80.
- De Marco, M. et al., 2016. Cognitive stimulation of the default-mode network modulates functional connectivity in healthy aging. *Brain Research Bulletin*, 121, pp.26–41.
- Marcovina, S.M. et al., 2007. Biochemical and bioimaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools. *Journal of Internal Medicine*, 261(3), pp.214–34.
- Marmot, M. et al., 2008. Closing the gap in a generation: health equity through action on the social determinants of health. *The Lancet*, 372(9650), pp.1661–1669.
- Marrugat, J. et al., 2004. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL

- oxidation--a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 43(3), pp.140–7.
- Martínez, J.A., Moreno, B. & Martínez-González, M.A., 2004. Prevalence of obesity in Spain. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 5(3), pp.171–2.
- Martínez-González, J., Llorente-Cortés, V. & Badimon, L., 2001. Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions. *Spanish Journal of Cardiology*, 54(2), pp.218–31.
- Massberg, S. et al., 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(7), pp.887–96.
- Massberg, S. et al., 2004. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*, 103(1), pp.136–142.
- Mateos, R. et al., 2016. Hydroxytyrosol in functional hydroxytyrosol-enriched biscuits is highly bioavailable and decreases oxidised low density lipoprotein levels in humans. *Food Chemistry*, 205, pp.248–256.
- Matsui-Hirai, H. et al., 2011. Dose-Dependent Modulatory Effects of Insulin on Glucose-Induced Endothelial Senescence In Vitro and In Vivo: A Relationship between Telomeres and Nitric Oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(3).
- Matsumoto, T. et al., 2004. Plasma level of oxidized low-density lipoprotein is an independent determinant of coronary macrovasomotor and microvasomotor responses induced by bradykinin. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(2), pp.451–7.
- McCall, D.O. et al., 2009. Dietary Intake of Fruits and Vegetables Improves Microvascular Function in Hypertensive Subjects in a Dose-Dependent Manner. *Circulation*, 119(16), pp.2153–2160.
- McFarlin, B.K., Strohecker, K.A. & Kueht, M.L., 2009. Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. *British Journal of Nutrition*, 102(1), p.54.
- Meade, T.W. et al., 1993. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *The Lancet (London, England)*, 342(8879), pp.1076–9.
- Medina-Remón, A. et al., 2014. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 25(1), pp.60–7.
- Medina-Remón, A. et al., 2011. Total polyphenol excretion and blood pressure in subjects at high cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(5), pp.323–331.
- Meisinger, C. et al., 2005. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation*, 112(5), pp.651–7.
- Méndez González, J., Martín Campos, J. & Ordóñez Llanos, J., 2008. The clinical laboratory and dyslipidemia. *Endocrinology and Nutrition*, 55(2), pp.89–96.
- Mertens-Talcott, S.U. et al., 2006. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), pp.8956–61.

- Metso, S. et al., 2004. Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein and Common Carotid Artery Intima-Media Thickness in a Random Sample of Middle-Aged Men. *Journal of Biomedical Science*, 11(3), pp.356–361.
- Metta, S. et al., 2015. Erythrocyte Antioxidant Defenses Against Cigarette Smoking in Ischemic Heart Disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(6), p.BC08-11.
- De Meyer, G. & Herman, A., 1997. Vascular endothelial dysfunction. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 39(4), pp.325–342.
- Meyers, M.R. & Gokce, N., 2007. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 14(5), pp.365–369.
- Miana, M. et al., 2012. Role of angiotensin II in the atherosclerotic process. *Clinic and Research in Arteriosclerosis*, 24(2), pp.92–101.
- Milne, G.L., Sanchez, S.C., et al., 2007. Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Nature Protocols*, 2(1), pp.221–6.
- Milne, G.L., Yin, H., et al., 2007. Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods in Enzymology*, 433, pp.113–26.
- Di Minno, A. et al., 2016. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature. *Antioxidants & Redox Signaling*, 24(10), pp.548–555.
- Minuz, P., Fava, C. & Lechi, A., 2006. Lipid peroxidation, isoprostanes and vascular damage. *Pharmacological Reports: PR*, (Suppl 58), pp.57–68.
- Mirmiran, P. et al., 2010. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *British Journal of Nutrition*, 104(3), pp.402–406.
- Misra, A. & Vikram, N.K., 2003. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 19(5), pp.457–66.
- Miura, K. et al., 2001. Relationship of blood pressure to 25-year mortality due to coronary heart disease, cardiovascular diseases, and all causes in young adult men: the Chicago Heart Association Detection Project in Industry. *Archives of Internal Medicine*, 161(12), pp.1501–8.
- Modena, M.G. et al., 2002. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(3), pp.505–10.
- Mohan, M., Waghulde, H. & Kasture, S., 2010. Effect of pomegranate juice on Angiotensin II-induced hypertension in diabetic Wistar rats. *Phytotherapy Research: PTR*, 24 Suppl 2(S2), pp.S196–203.
- Mongraw-Chaffin, M.L. et al., 2015. The sex-specific association between BMI and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of 95 cohorts with 1.2 million participants. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 3(6), pp.437–449.
- Montero, D. & Díaz-Cañestro, C., 2016. Endurance training and maximal oxygen consumption with ageing: Role of maximal cardiac output and oxygen extraction. *European Journal of Preventive Cardiology*, 23(7), pp.733–743.
- Montezano, A.C. & Touyz, R.M., 2012. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function - Role of

- Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 110(1), pp.87–94.
- Montuschi, P., Barnes, P. & Roberts, L.J., 2007. Insights into oxidative stress: the isoprostanes. *Current Medicinal Chemistry*, 14(6), pp.703–17.
- Moore, K.J. & Tabas, I., 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), pp.341–55.
- Moreiras, G.V., 2015. Problemática nutricional en la población femenina española ; resultados del Estudio ANIBES. *Nutrición Hospitalaria*, 32, pp.14–19.
- Moreno-Luna, R. et al., 2012. Olive Oil Polyphenols Decrease Blood Pressure and Improve Endothelial Function in Young Women with Mild Hypertension. *American Journal of Hypertension*, 25(12), pp.1299–1309.
- Morgan, K. et al., 2000. Healthy ageing in urban and rural Britain: a comparison of exercise and diet. *Age and Ageing*, 29(4), pp.341–8.
- Morley, J.E., 2017. Nutrition and Aging Well. *Journal of the American Medical Directors Association*, 18(2), pp.91–94.
- Morrow, J., 2006. The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des*, 12(8), pp.895–902.
- Morrow, J. & Fam, S., 2003. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr Med Chem*, 10(17), pp.1723–40.
- Mulvihill, E.E. & Huff, M.W., 2010. Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. *The Canadian Journal of Cardiology*, 26(Suppl A), p.17A–21A.
- Mulvihill, N.T. et al., 2002. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *European Heart Journal*, 23(20), pp.1569–74.
- Munro, L.H., Burton, G. & Kelly, F.J., 1997. Plasma RRR- α -tocopherol concentrations are lower in smokers than in non-smokers after ingestion of a similar oral load of this antioxidant vitamin. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 92(1), pp.87–93.
- Murotomi, K. et al., 2015. Oleuropein-Rich Diet Attenuates Hyperglycemia and Impaired Glucose Tolerance in Type 2 Diabetes Model Mouse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(30), pp.6715–22.
- Nakashima, Y. et al., 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular biology*, 18(5), pp.842–51.
- Nakhjavani, M. et al., 2010. Serum oxidized-LDL is associated with diabetes duration independent of maintaining optimized levels of LDL-cholesterol. *Lipids*, 45(4), pp.321–7.
- Naruko, T., 2006. Persistent High Levels of Plasma Oxidized Low-Density Lipoprotein After Acute Myocardial Infarction Predict Stent Restenosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), pp.877–883.
- Naruse, K. et al., 2006. Activation of vascular protein kinase C- β inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*, 55(3), pp.691–8.

- NCEP/ATP III, 2001. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 285(19), pp.2486–97.
- NCEP/ATP III, 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation*, 106(25), pp.3143–421.
- Ndrepepa, G. et al., 2009. Total leucocyte count, but not C-reactive protein, predicts 1-year mortality in patients with acute coronary syndromes treated with percutaneous coronary intervention. *Clinical Science*, 116(8).
- Németh, B. et al., 2016. Asymmetric dimethylarginine: predictor of cardiovascular diseases? *Orvosi Hetilap*, 157(13), pp.483–487.
- Nesto, R.W., 2005. Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions*, 5(6), pp.379–87.
- Newby, A.C. & Zaltsman, A.B., 1999. Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovascular Research*, 41(2), pp.345–60.
- Newman, A. et al., 2010. The 10 keys to healthy aging: findings from an innovative prevention program in the community. *Journal Aging Health*, 22(5), pp.547–66.
- Nguyen-Duy, T.-B. et al., 2003. Visceral fat and liver fat are independent predictors of metabolic risk factors in men. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 284(6), pp.E1065-71.
- Nicklas, B.J. et al., 2004. Association of visceral adipose tissue with incident myocardial infarction in older men and women: the Health, Aging and Body Composition Study. *American Journal of Epidemiology*, 160(8), pp.741–9.
- de Nigris, F. et al., 2005. Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), pp.4896–901.
- De Nigris, F. et al., 2007. Effects of a Pomegranate Fruit Extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. *Cardiovascular Research*, 73(2), pp.414–423.
- de Nigris, F. et al., 2006. Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. *Nitric Oxide*, 15(3), pp.259–263.
- de Nigris, F. et al., 2007. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry/ Official Journal of the Nitric Oxide Society*, 17(1), pp.50–4.
- NIH, 1998. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults-The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obesity Research*, 6(Suppl 2), p.51S–209S.

- Nishi, K. et al., 2002. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(10), pp.1649–54.
- Njajou, O.T. et al., 2009. Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 25(8), pp.733–739.
- Norata, G.D. et al., 2002. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 12(5), pp.297–305.
- Nordestgaard, B.G. et al., 2007. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*, 298(3), pp.299–308.
- Nwose, E.U., Richards, R.S. & Bwititi, P.T., 2014. Cardiovascular risks in prediabetes: preliminary data on vasculopathy triad. *North American Journal of Medical Sciences*, 6(7), pp.328–32.
- Nyamdorj, R. et al., 2008. BMI Compared With Central Obesity Indicators in Relation to Diabetes and Hypertension in Asians. *Obesity*, 16(7), pp.1622–1635.
- Nyunoya, T. et al., 2009. Cigarette smoke induces cellular senescence via werner's syndrome protein down-regulation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(4), pp.279–287.
- O'Brien, K.D. et al., 1996. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 93(4), pp.672–82.
- O'Rourke, M.F. & Hashimoto, J., 2007. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(1), pp.1–13.
- Ogawa, K. et al., 2015. Increase in the oxidised low-density lipoprotein level by smoking and the possible inhibitory effect of statin therapy in patients with cardiovascular disease: a retrospective study. *BMJ Open*, 5(1), p.e005455.
- Olefsky, J., Reaven, G.M. & Farquhar, J.W., 1974. Effects of weight reduction on obesity. Studies of lipid and carbohydrate metabolism in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 53(1), pp.64–76.
- Oliveira, A., Rodríguez-Artalejo, F. & Lopes, C., 2009. The association of fruits, vegetables, antioxidant vitamins and fibre intake with high-sensitivity C-reactive protein: sex and body mass index interactions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(11), pp.1345–52.
- Oomen, C.M. et al., 2001. Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. *The Lancet (London, England)*, 357(9258), pp.746–51.
- Van den Oord, S.C.H. et al., 2013. Effect of carotid plaque screening using contrast-enhanced ultrasound on cardiovascular risk stratification. *The American Journal of Cardiology*, 111(5), pp.754–9.
- Orchard, T.J. et al., 1999. Antibodies to oxidized LDL predict coronary artery disease in type 1 diabetes: a nested case-control study from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes*, 48(7), pp.1454–8.

- Ortega, R. et al., 2013. DIAL software for assessing diets and food calculations (for Windows, version 3.0.0.5). *Department of Nutrition (UCM) & Alceingeniería, S.A.* Available at: <http://www.alceingenieria.net/nutricion/descarga.htm> [Accessed September 10, 2016].
- Ortega, R. et al., 2012. *Nutritional objectives for the Spanish population. The Department of Nutrition, Faculty of Pharmacy of Complutense University*, Madrid, Spain.
- Ortega, R.M. et al., 1995. Energy balance and caloric profile in the elderly obese or in those with overweight compared to those of normal weight. *Clinical Medicine*, 104(14), pp.526–9.
- Ortega, R.M. et al., 1996. Estimated energy balance in female university students: differences with respect to body mass index and concern about body weight. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 20(12), pp.1127–9.
- Ortega, R.M. et al., 1997. Underestimation of energy intake in a group of young female university students of Madrid. *Spanish Clinical Journal*, 197(8), pp.545–9.
- Ortega, R.M., Perez-Rodrigo, C. & Lopez-Sobaler, A.M., 2015. Dietary assessment methods: dietary records. *Spanish Journal of Community Nutrition*, 21(Supl.1), pp.34–41.
- Ortega RM, Jiménez AI, Perea JM, N.B., 2014. Desequilibrios nutricionales en la dieta media española; barreras en la mejora. *Nutrición Hospitalaria*, 30(Suppl 2), pp.29–35.
- Osiewacz, H.D., 1997. Genetic regulation of aging. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 75(10), pp.715–27.
- Ostertag, L.M. et al., 2010. Impact of dietary polyphenols on human platelet function “ A critical review of controlled dietary intervention studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), pp.60–81.
- Osto, E. et al., 2008. c-Jun N-terminal kinase 2 deficiency protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Circulation*, 118(20), pp.2073–80.
- Otsuka, R. et al., 2001. Acute effects of passive smoking on the coronary circulation in healthy young adults. *JAMA*, 286(4), pp.436–41.
- Owen, R.W. et al., 2000. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet. Oncology*, 1, pp.107–12.
- Oyebode, O. et al., 2014. Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 68(9), pp.856–62.
- Padwal, R. et al., 2016. Relationship Among Body Fat Percentage, Body Mass Index, and All-Cause Mortality. *Annals of Internal Medicine*, 164(8), p.532.
- Paik, J.K. et al., 2013. Effect of age on atherogenicity of LDL and inflammatory markers in healthy women. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 23(10), pp.967–72.
- Pais, P., Villar, A. & Rull, S., 2016. Impact of a Proprietary Standardized Olive Fruit Extract (SOFE) on Cardio-Ankle Vascular Index, Visual Analog Scale and C-Reactive Protein Assessments in Subjects with Arterial Stiffness Risk. *Drugs in R&D*, 16(4), pp.355–368.
- Paiva-Martins, F. et al., 2006. Effects of copper on the antioxidant activity of olive polyphenols in bulk oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10),

- pp.3738–43.
- Paiva-Martins, F. & Gordon, M.H., 2005. Interactions of Ferric Ions with Olive Oil Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), pp.2704–2709.
- Palatini, P., 2007. Heart rate as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence and basic mechanisms. *Drugs*, 67(Suppl 2), pp.3–13.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Barulli, M.R., et al., 2015. Cognitive Frailty: A Systematic Review of Epidemiological and Neurobiological Evidence of an Age-Related Clinical Condition. *Rejuvenation Research*, 18(5), pp.389–412.
- Panza, F., Solfrizzi, V. & Logroscino, G., 2015. Age-related hearing impairment—a risk factor and frailty marker for dementia and AD. *Nature Reviews Neurology*, 11(3), pp.166–175.
- Panza, J.A. et al., 1990. Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Patients with Essential Hypertension. *New England Journal of Medicine*, 323(1), pp.22–27.
- Páramo, J.A., Orbe, J. & Rodríguez, J.A., 2003. Atheroma plaque stabilization: a new concept based on the dynamic biology of atherosclerosis. *Clinical Medicine*, 121(15), pp.583–7.
- Paravicini, T.M. & Touyz, R.M., 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, pp.S170–80.
- Park, D.-W. et al., 2013. Association of Body Mass Index With Major Cardiovascular Events and With Mortality After Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 6(2), pp.146–153.
- Park, K. et al., 2009. Oxidative stress and insulin resistance: the coronary artery risk development in young adults study. *Diabetes Care*, 32(7), pp.1302–7.
- Park, K.-H. et al., 2011. Clinical significance of framingham risk score, flow-mediated dilation and pulse wave velocity in patients with stable angina. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 75(5), pp.1177–83.
- Parrinello, C.M. et al., 2015. Six-year change in high-sensitivity C-reactive protein and risk of diabetes, cardiovascular disease, and mortality. *American Heart Journal*, 170(2), pp.380–9.
- Patel, A.R. et al., 2009. Modestly Overweight Women Have Vascular Endothelial Dysfunction. *Clinical Cardiology*, 32(5), pp.269–273.
- Patel, C. et al., 2008. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), pp.2728–2735.
- Patel, P. & Abate, N., 2013a. Body Fat Distribution and Insulin Resistance. *Nutrients*, 5(6), pp.2019–2027.
- Patel, P. & Abate, N., 2013b. Role of Subcutaneous Adipose Tissue in the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Journal of Obesity*, 2013, p.489187.
- Pearson, T.A. et al., 2003. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107(3), pp.499–511.
- Peng, G.-S. & Yin, S.-J., 2009. Effect of the allelic variants of aldehyde dehydrogenase ALDH2*2 and alcohol dehydrogenase ADH1B*2 on blood acetaldehyde concentrations. *Human Genomics*,

- 3(2), pp.121–7.
- Penn, M.S. & Chisolm, G.M., 1994. Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, (Suppl 108), pp.S21–9.
- Perrinjaquet-Moccetti, T. et al., 2008. Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research*, 22(9), pp.1239–1242.
- Perry, H.M. et al., 2000. Effect of treating isolated systolic hypertension on the risk of developing various types and subtypes of stroke: the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *JAMA*, 284(4), pp.465–71.
- Perticone, F. et al., 2001. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*, 104(2), pp.191–6.
- Petrosino, T. & Serafini, M., 2014. Antioxidant modulation of F2-isoprostanes in humans: a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(9), pp.1202–21.
- Piantadosi, S., 2005. *Crossover Designs 2^a*, Chichester, UK: A John Wiley & Sons, Inc.
- Piper, M. et al., 2014. *Screening for High Blood Pressure in Adults: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. The Agency for Healthcare Research and Quality U.S.*, Maryland, U.S.A.
- Pirillo, A., Norata, G.D. & Catapano, A.L., 2013. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2013, p.152786.
- Pitsavos, C. et al., 2005. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(3), pp.694–9.
- Plant, S. et al., 2008. Adiponectin attenuates endothelial dysfunction induced by oxidised low-density lipoproteins. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 5(2), pp.102–108.
- Poledne, R., Králová Lesná, I. & Čejková, S., 2015. Adipose tissue and atherosclerosis. *Physiological Research*, 64(Suppl 3), pp.S395–402.
- Poston, R.N. et al., 1992. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *The American Journal of Pathology*, 140(3), pp.665–73.
- Potenza, M.A. et al., 2009. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Current Medicinal Chemistry*, 16(1), pp.94–112.
- Pouliot, M.C. et al., 1994. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *The American Journal of Cardiology*, 73(7), pp.460–8.
- Pryor, W. a, 1986. OXY-RADICALS AND RELATED and Reactions. *Annual Review of Physiology*, 48, pp.657–667.
- Puranik, R. & Celermajer, D.S., 2003. Smoking and endothelial function. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 45(6), pp.443–458.
- Puri, K.S. et al., 2009. Declaration of Helsinki, 2008: implications for stakeholders in research. *Journal of Postgraduate Medicine*, 55(2), pp.131–4.
- Puurunen, M. et al., 1994. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial

- infarction. *Archives of Internal Medicine*, 154(22), pp.2605–9.
- Quinn, M.T. et al., 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(9), pp.2995–2998.
- Quinn, M.T., Parthasarathy, S. & Steinberg, D., 1988. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(8), pp.2805–9.
- Raederstorff, D., 2009. Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Humans: a Review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79(3), pp.152–165.
- Rahman, M., Williams, G. & Mamun, A. Al, 2017. Hypertension and diabetes prevalence among adults with moderately increased BMI (23.0–24.9 kg/m²): findings from a nationwide survey in Bangladesh. *Public Health Nutrition*, pp.1–8.
- Raitakari, M. et al., 2004. Weight Reduction With Very-Low-Caloric Diet and Endothelial Function in Overweight Adults: Role of Plasma Glucose. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(1), pp.124–128.
- Rajavashisth, T.B. et al., 1998. Inflammatory Cytokines and Oxidized Low Density Lipoproteins Increase Endothelial Cell Expression of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(17), pp.11924–11929.
- Ramos-Arellano, L.E. et al., 2014. Circulating CD36 and oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects. *BMC Cardiovascular Disorders*, 14, p.54.
- Ras, R.T. et al., 2013. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *International Journal of Cardiology*, 168(1), pp.344–51.
- Ray, A., Huisman, M. V & Rabelink, T.J., 2015. Can and should carotid ultrasound be used in cardiovascular risk assessment?: the internist's perspective. *European Journal of Internal Medicine*, 26(2), pp.112–7.
- Razquin, C. et al., 2009. A 3 years follow-up of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight gain. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(12), pp.1387–1393.
- Redon, J., 2001. Hypertension in obesity. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 11(5), pp.344–53.
- Rees, K. et al., 2013. "Mediterranean" dietary pattern for the primary prevention of cardiovascular disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(8), p.CD009825.
- Reidy, M. & Bowyer, D., 1993. Control of arterial smooth muscle cell proliferation. *Curr Opin in Lipidol*, 4, pp.349–54.
- Reis, J.P. et al., 2009. Comparison of Overall Obesity and Body Fat Distribution in Predicting Risk of Mortality. *Obesity*, 17(6), pp.1232–9.
- Reerani, M.K. et al., 2011. Effects of statins on coronary and peripheral endothelial function in humans: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and*

- Exercise Physiology*, 18(5), pp.704–16.
- Ribeiro, F. et al., 2009. Endothelial function and atherosclerosis: circulatory markers with clinical usefulness. *Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology*, 28(10), pp.1121–51.
- Ricart-Jané, D., Llobera, M. & López-Tejero, M.D., 2002. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry/Official Journal of the Nitric Oxide Society*, 6(2), pp.178–85.
- Riccioni, G. et al., 2014. ADMA/SDMA in Elderly Subjects with Asymptomatic Carotid Atherosclerosis: Values and Site-Specific Association. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), pp.6391–6398.
- Ridker, P.M., Hennekens, C.H., et al., 2000. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *The New England Journal of Medicine*, 342(12), pp.836–43.
- Ridker, P.M., Rifai, N., et al., 2000. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101(15), pp.1767–72.
- Ridker, P.M. et al., 1998. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *The Lancet (London, England)*, 351(9096), pp.88–92.
- Del Rio, D. et al., 2013. Dietary polyphenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), pp.1818–92.
- Rizzo, M. et al., 2010. Should we measure routinely oxidised and atherogenic dense low-density lipoproteins in subjects with type 2 diabetes? *International Journal of Clinical Practice*, 64(12), pp.1632–1642.
- Robare, J.F. et al., 2011. The “10 Keys” to Healthy Aging: 24-Month Follow-Up Results From an Innovative Community-Based Prevention Program. *Health Education & Behavior*, 38(4), pp.379–388.
- Roberts, J.L. & Moreau, R., 2016. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food & Function*, 7(8), pp.3337–53.
- Rock, W. et al., 2008. Consumption of Wonderful Variety Pomegranate Juice and Extract by Diabetic Patients Increases Paraoxonase 1 Association with High-Density Lipoprotein and Stimulates Its Catalytic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), pp.8704–8713.
- Rohde, L.E. et al., 1998. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(11), pp.1765–70.
- Rosenblat, M. et al., 2015. Anti-atherogenic properties of date vs. pomegranate polyphenols: the benefits of the combination. *Food & Function*, 6(5), pp.1496–1509.
- Rosenblat, M. & Aviram, M., 2011. Pomegranate juice protects macrophages from triglyceride accumulation: inhibitory effect on DGAT1 activity and on triglyceride biosynthesis. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 58(1), pp.1–9.
- Rosenblat, M., Hayek, T. & Aviram, M., 2006. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ)

- consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, 187(2), pp.363–71.
- Rosenblat, M., Volkova, N. & Aviram, M., 2013. Pomegranate phytosterol (β -sitosterol) and polyphenolic antioxidant (punicalagin) addition to statin, significantly protected against macrophage foam cells formation. *Atherosclerosis*, 226(1), pp.110–7.
- Rosenfeld, M.E. et al., 1990. Macrophages, endothelial cells, and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Toxicologic Pathology*, 18(4 Pt 1), pp.560–71.
- Rosignoli, P. et al., 2013. Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), pp.1513–1519.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2), pp.115–26.
- Rozenberg, O., Howell, A. & Aviram, M., 2006. Pomegranate juice sugar fraction reduces macrophage oxidative state, whereas white grape juice sugar fraction increases it. *Atherosclerosis*, 188(1), pp.68–76.
- Ruano, J. et al., 2005. Phenolic Content of Virgin Olive Oil Improves Ischemic Reactive Hyperemia in Hypercholesterolemic Patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(10), pp.1864–1868.
- Ruberg, F. & Loscalzo, J., 2005. Inflammation and atherothrombosis. *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis*, pp.45–60.
- Rubin, J. et al., 2012. The relationship between resting heart rate and incidence and progression of coronary artery calcification: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*, 220(1), pp.194–200.
- Rubinshtein, R. et al., 2010. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *European Heart Journal*, 31(9), pp.1142–1148.
- Ruiz, E. et al., 2015. Energy Intake, Profile, and Dietary Sources in the Spanish Population: Findings of the ANIBES Study. *Nutrients*, 7(6), pp.4739–62.
- Ruiz-Esparza, J. et al., 2013. Relationship of food groups intake and C-reactive protein in healthy adults from Mexicali, Baja California, México. *Clinical Research*, 54(3), pp.246–56.
- Ruiz-Garcia, J. & Alegria-Barrero, E., 2016. Cardiovascular Safety in Drug Development: A Role for Endothelial Function Tests. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 21(6), pp.507–515.
- Ryliskyte, L. et al., 2004. High-frequency ultrasonographic imaging of the endothelium-dependent flow-mediated dilatation (FMD) in a brachial artery: normative ranges in a group of low CV risk subjects of different ages. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 47, pp.67–8.
- Sabater-Lleal, M. et al., 2013. Multiethnic meta-analysis of genome-wide association studies in >100 000 subjects identifies 23 fibrinogen-associated Loci but no strong evidence of a causal association between circulating fibrinogen and cardiovascular disease. *Circulation*, 128(12), pp.1310–24.

- Sagun, G. et al., 2015. Levels of F2 isoprostane in Behcet's disease: Correlation with cardiometabolic risk factors. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 20(5), pp.223–7.
- Sahebkar, A. et al., 2017. Effects of pomegranate juice on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research*, 115, pp.149–161.
- Sala-Vila, A. et al., 2016. Dietary α Linolenic Acid, Marine ω -3 Fatty Acids, and Mortality in a Population With High Fish Consumption: Findings From the PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) Study. *Journal of the American Heart Association*, 5(1), p.e002543.
- Salonen, J.T. et al., 1992. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *The Lancet (London, England)*, 339(8798), pp.883–7.
- Sampietro, T. et al., 2005. High-density lipoproteins: the new target of cardiovascular medicine. *Italian Heart Journal. Supplement: Official Journal of the Italian Federation of Cardiology*, 6(6), pp.341–53.
- Santangelo, C. et al., 2016. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(11), pp.1295–1301.
- Santos-García, D. et al., 2011. Impaired Brachial Flow-Mediated Dilation Is a Predictor of a New-Onset Vascular Event after Stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 32(2), pp.155–163.
- Sata, M. & Walsh, K., 1998. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*, 102(9), pp.1682–1689.
- Sato, H. et al., 2007. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(4), pp.793–8.
- Sattar, N. et al., 2009. Are markers of inflammation more strongly associated with risk for fatal than for nonfatal vascular events? *PLoS Medicine*, 6(6), p.e1000099.
- Savic-Radojevic, A. et al., 2013. The role of serum VCAM-1 and TNF- α as predictors of mortality and morbidity in patients with chronic heart failure. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27(2), pp.105–12.
- Savini, I. et al., 2013. Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), pp.10497–10538.
- Schmidt, K. et al., 1992. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *The Biochemical Journal*, pp.297–300.
- Schrag, M. et al., 2013. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis. *Neurobiology of Disease*, 59, pp.100–110.
- Schroder, H. et al., 2006. Alcohol consumption is directly associated with circulating oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(8), pp.1474–1481.
- Schubert, S.Y., Neeman, I. & Resnick, N., 2002. A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(14), pp.1931–3.
- Schwartz, C.J. et al., 1991. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clinical Cardiology*, 14(2)

- Suppl 1), pp.I1-16.
- Schwingshackl, L., Christoph, M. & Hoffmann, G., 2015. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 7(9), pp.7651-75.
- Schwingshackl, L. & Hoffmann, G., 2014. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids in Health and Disease*, 13, p.154.
- Schwingshackl & Hoffmann, G., 2014. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: A systematic review and meta-analysis of intervention trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(9), pp.929-939.
- Scoditti, E. et al., 2015. Additive regulation of adiponectin expression by the mediterranean diet olive oil components oleic Acid and hydroxytyrosol in human adipocytes. *PLOS ONE*, 10(6), p.e0128218.
- Scott, J., 2002. The pathogenesis of atherosclerosis and new opportunities for treatment and prevention. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, (63), pp.1-17.
- SEA, 2013. *Guía Clínica para la detección, diagnóstico y tratamiento de la Dislipemia aterogénica en Atención Primaria. La Sociedad Española de Arteriosclerosis*, Madrid, España.
- Seccareccia, F. et al., 2001. Heart rate as a predictor of mortality: the MATISS project. *American Journal of Public Health*, 91(8), pp.1258-63.
- Sedef, N. & Karakaya, S., 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67(11), pp.632-638.
- SEEDO, 2000. Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of criteria for therapeutic intervention. Spanish Society for the Study of Obesity. *Clinical Medicine*, 115(15), pp.587-97.
- SEEDO, 2007. Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria. Spanish Society for the Study of Obesity. *Obesity Journal of Spain*, 128(5), pp.7-48.
- SEEDO, 1996. Spanish consensus for the evaluation of obesity and to carry out epidemiologic studies. Spanish Society for the Study of Obesity. *Clinical Medicine*, 107(20), pp.782-7.
- Sehested, T.S.G. et al., 2010. Measures of overweight and obesity and risk of cardiovascular disease: a population-based study. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 17(4), pp.486-490.
- SEH-LELHA, 2005. Definición y clasificación de la hipertensión arterial por la Sociedad Española de Hipertensión (SEH) y la Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (LELHA). *Hipertensión*, 22(2), pp.3-8.
- Sena, C.M., Pereira, A.M. & Seica, R., 2013. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(12), pp.2216-2231.
- SENC, 2004. *Guía de la alimentación saludable elaborada por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria*, Madrid, España.
- SENC, 2016. Guías alimentarias para la población española. La nueva pirámide de la alimentación

- saludable elaborada por el Grupo Colaborativo de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. *Nutrición Hospitalaria*, 33(8), pp.1–48.
- Senn, S., 2003. *Cross-over Trials in Clinical Research*. 2ª., Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Serra Majem, L., 2011. Objetivos nutricionales para la población española: consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria 2011. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*, 17(4), pp.178–199.
- Sesso, H.D. et al., 2000. Systolic and diastolic blood pressure, pulse pressure, and mean arterial pressure as predictors of cardiovascular disease risk in Men. *Hypertension*, 36(5), pp.801–7.
- Seven, E. et al., 2016. Abdominal Adiposity Distribution Quantified by Ultrasound Imaging and Incident Hypertension in a General Population. *Hypertension*, 68(5), pp.1115–1122.
- Shah, T. et al., 2009. Critical appraisal of CRP measurement for the prediction of coronary heart disease events: new data and systematic review of 31 prospective cohorts. *International Journal of Epidemiology*, 38(1), pp.217–31.
- Shahbaz, H.M. et al., 2016. Assessment of Antioxidant Potential of Pomegranate Fruit By-Products via a Direct Approach Using a Simple QUENCHER Method. *Journal of AOAC International*, 99(3), pp.599–603.
- Shanmuganayagam, D. et al., 2012. Differential Effects of Grape (*Vitis vinifera*) Skin Polyphenolics on Human Platelet Aggregation and Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), pp.5787–5794.
- Shao, J. et al., 2016. Punicalagin Prevents Hypoxic Pulmonary Hypertension via Anti-Oxidant Effects in Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 44(4), pp.785–801.
- Shechter, M. et al., 2009. Long-term association of brachial artery flow-mediated vasodilation and cardiovascular events in middle-aged subjects with no apparent heart disease. *International Journal of Cardiology*, 134(1), pp.52–8.
- Shechter, M. et al., 2014. Usefulness of brachial artery flow-mediated dilation to predict long-term cardiovascular events in subjects without heart disease. *The American Journal of Cardiology*, 113(1), pp.162–7.
- Shi, Y. & Vanhoutte, P.M., 2017. Macro- and Microvascular Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Journal of Diabetes*.
- Shimada, K. et al., 2004. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 174(2), pp.343–7.
- Shimokawa, H. et al., 1996. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 28(5), pp.703–11.
- Shirpoor, A. et al., 2013. Ethanol promotes rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation via increase of homocysteine and oxidized-low-density lipoprotein. *Journal of Cardiology*, 62, pp.374–378.
- Shoji, T. et al., 2002. Antibody to oxidized low-density lipoprotein and cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Kidney International*, 62(6), pp.2230–2237.
- Sierksma, Muller, et al., 2004. Alcohol consumption and arterial stiffness in men. *Journal of*

- Hypertension*, 22(2), pp.357–62.
- Sierksma, Lebrun, et al., 2004. Alcohol consumption in relation to aortic stiffness and aortic wave reflections: a cross-sectional study in healthy postmenopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(2), pp.342–348.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), p.31S–38S.
- Sigala, F. et al., 2010. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *Journal of Vascular Surgery*, 52(3), pp.704–13.
- Sigurdardottir, V., Fagerberg, B. & Hulthe, J., 2002. Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *Journal of Internal Medicine*, 252(5), pp.440–7.
- Silva, S. et al., 2015. Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(4), pp.360–368.
- Simionescu, M., 2007. Implications of Early Structural-Functional Changes in the Endothelium for Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(2), pp.266–274.
- Sirimarco, G. et al., 2014. Atherogenic Dyslipidemia and Residual Cardiovascular Risk in Statin-Treated Patients. *Stroke*, 45(5), pp.1429–1436.
- Smirnova, I. V. et al., 2004. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), pp.H782–H790.
- Smith, S.C. et al., 2011. AHA/ACCF Secondary Prevention and Risk Reduction Therapy for Patients With Coronary and Other Atherosclerotic Vascular Disease: 2011 Update: A Guideline From the American Heart Assoc. *Circulation*, 124(22), pp.2458–2473.
- Soerensen, M., 2012. Genetic variation and human longevity. *Danish Medical Journal*, 59(5), p.B4454.
- Sohrab, G. et al., 2014. Effects of pomegranate juice consumption on inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(3), pp.215–20.
- Sohrab, G. et al., 2017. Effects of pomegranate juice consumption on oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a single-blind, randomized clinical trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(2), pp.249–255.
- Sohrab, G. et al., 2015. Pomegranate (*Punicagranatum*) juice decreases lipid peroxidation, but has no effect on plasma advanced glycated end-products in adults with type 2 diabetes: a randomized double-blind clinical trial. *Food & Nutrition Research*, 59, p.28551.
- Soldatos, G., Cooper, M.E. & Jandeleit-Dahm, K.A.M., 2005. Advanced-glycation end products in insulin-resistant states. *Current Hypertension Reports*, 7(2), pp.96–102.
- Song, X. et al., 2015. Cardiovascular and all-cause mortality in relation to various anthropometric measures of obesity in Europeans. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(3), pp.295–304.

- Song, X. et al., 2013. Comparison of various surrogate obesity indicators as predictors of cardiovascular mortality in four European populations. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67(12), pp.1298–1302.
- Soni, M.G. et al., 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), pp.903–915.
- Sorensen, K.E. et al., 1995. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *British Heart Journal*, 74(3), pp.247–53.
- Springer, T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2), pp.301–14.
- Squier, T.C., 2001. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), pp.1539–50.
- Stacey, R.B. et al., 2009. Modification of the effect of glycemic status on aortic distensibility by age in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Hypertension*, 55(1).
- Stein, O. & Stein, Y., 1995. Smooth muscle cells and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 6(5), pp.269–74.
- Steinberg, D. et al., 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal of Medicine*, 320(14), pp.915–24.
- Steves, C., Spector, T. & Jackson, S., 2012. Ageing, genes, environment and epigenetics: what twin studies tell us now, and in the future. *Age and Ageing*, 41(5), pp.581–6.
- Stewart, R.A.H. et al., 2005. White Blood Cell Count Predicts Reduction in Coronary Heart Disease Mortality With Pravastatin. *Circulation*, 111(14).
- Stiko-Rahm, A. et al., 1992. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology/American Heart Association*, 12(9), pp.1099–109.
- Stocker, R. & Keaney, J.F., 2004. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84(4), pp.1381–1478.
- Stone, G.W. et al., 2011. A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 364(3), pp.226–235.
- Stone, N.J. et al., 2014. 2013 AHA/ACC Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *Circulation*, 129(Suppl 2), pp.S1–S45.
- Storniolo, C.E. et al., 2014. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biology*, 2, pp.971–977.
- St-Pierre, A.C. et al., 2005. Inflammatory markers and long-term risk of ischemic heart disease in men A 13-year follow-up of the Quebec Cardiovascular Study. *Atherosclerosis*, 182(2), pp.315–21.
- Strazzullo, P. et al., 2009. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ*, 339, p.b4567.
- Strehler, B., 1962. *Time, Cells and Aging*. 1^a, New York, U.S.A: Academic Press.
- Strobel, N.A. et al., 2011. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease.

- International Journal of Cardiology*, 147(2), pp.191–201.
- Suboc, T.M. et al., 2013. Moderate Obesity and Endothelial Dysfunction in Humans: Influence of Gender and Systemic Inflammation. *Physiological Reports*, 1(3).
- Suganya, N. et al., 2016. Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 116(2), pp.223–246.
- Susalit, E. et al., 2011. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4), pp.251–258.
- Suzuki, T. et al., 2002. Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*, 35(5), pp.347–53.
- Svobodova, M. et al., 2014. Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Genes & Nutrition*, 9(1), p.376.
- Szmitko, P.E., Wang, C.-H., Weisel, R.D., Jeffries, G.A., et al., 2003. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*, 108(17), pp.2041–8.
- Szmitko, P.E., Fedak, P.W.M., et al., 2003. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*, 107(24), pp.3093–100.
- Szmitko, P.E., Wang, C.-H., Weisel, R.D., de Almeida, J.R., et al., 2003. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*, 108(16), pp.1917–23.
- Taberner, M. et al., 2014. Comparative evaluation of the metabolic effects of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives (hydroxytyrosyl acetate and ethyl hydroxytyrosyl ether) in hypercholesterolemic rats. *Food & Function*, 5(7), p.1556.
- Taddei, S. et al., 1996. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*, 94(6), pp.1298–303.
- Taddei, S. & Salvetti, A., 1996. Pathogenetic factors in hypertension. Endothelial factors. *Clinical and Experimental Hypertension*, 18(3–4), pp.323–35.
- Takahashi, M. et al., 1996. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*, 8(11), pp.817–21.
- Tang, E.H.C. & Vanhoutte, P.M., 2010. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflügers Archiv- European Journal of Physiology*, 459(6), pp.995–1004.
- Tangney, C.C. & Rasmussen, H.E., 2013. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 15(5), p.324.
- Taylor, R.S. et al., 2011. Reduced Dietary Salt for the Prevention of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials (Cochrane Review). *American Journal of Hypertension*, 24(8), pp.843–853.
- Tejada, S. et al., 2016. Cardioprotective effects of the polyphenol hydroxytyrosol from olive oil. *Current Drug Targets*.
- Thanassoulis, G. et al., 2012. Relations of exercise blood pressure response to cardiovascular risk factors and vascular function in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 125(23), pp.2836–43.
- The Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2010. Diabetes mellitus, fasting blood glucose

- concentration and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet*, 375(9733), pp.2215–2222.
- Thomopoulos, C., Parati, G. & Zanchetti, A., 2016. Effects of blood-pressure-lowering treatment in hypertension: Discontinuations for adverse events attributed to different classes of antihypertensive drugs: meta-analyses of randomized trials. *Journal of Hypertension*, 34(10), pp.1921–32.
- Thompson, A.M. et al., 2011. Association of obesity and biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in adults in Inner Mongolia, China. *International Journal of Cardiology*, 150(3), pp.247–252.
- Thomson, M.J., Puntmann, V. & Kaski, J.-C., 2007. Atherosclerosis and Oxidant Stress: The End of the Road for Antioxidant Vitamin Treatment? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 21(3), pp.195–210.
- Thorin, E. et al., 1994. Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidized LDL abolishes prostacyclin release. *Arteriosclerosis and Thrombosis: a Journal of Vascular Biology*, 14(3), pp.453–9.
- Threapleton, D.E. et al., 2013. Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 347, p.f6879.
- Thuillez, C. & Richard, V., 2005. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. *Journal of Human Hypertension*, 19, pp.S21–S25.
- Tiano, L. et al., 2007. Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: a double-blind, randomized controlled study. *European Heart Journal*, 28(18), pp.2249–2255.
- Toikka, J.O. et al., 2002. Decreased large artery distensibility in borderline hypertension is related to increased in vivo low-density lipoprotein oxidation. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62(4), pp.301–6.
- Toikka, J.O. et al., 2000. Increased arterial intima-media thickness and in vivo LDL oxidation in young men with borderline hypertension. *Hypertension*, 36(6), pp.929–33.
- Toshima, S. -i. et al., 2000. Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein Levels : A Biochemical Risk Marker for Coronary Heart Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(10), pp.2243–2247.
- Tousoulis, D. et al., 2003. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart (British Cardiac Society)*, 89(9), pp.993–7.
- Townsend, N. et al., 2015. Cardiovascular disease in Europe: Epidemiological update 2015. *European Heart Journal*, 36, pp.2696–2705.
- Townsend, N. et al., 2016. Cardiovascular disease in Europe: Epidemiological update 2016. *European Heart Journal*, 0, pp.1–14.
- Tresserra-Rimbau, A. et al., 2014. Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 24(6), pp.639–47.
- Trpkovic, A. et al., 2015. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases.

- Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 52(2), pp.70–85.
- Tsang, C. et al., 2012. Intake of polyphenol-rich pomegranate pure juice influences urinary glucocorticoids, blood pressure and homeostasis model assessment of insulin resistance in human volunteers. *Journal of Nutritional Science*, 1(9), pp.1–9.
- Tsimikas, S. et al., 2006. Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: five-year prospective results from the Bruneck study. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(11), pp.2219–28.
- Tsimikas, S. et al., 2003. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(3), pp.360–70.
- Tsutsui, T. et al., 2002. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(6), pp.957–62.
- Tsuzura, S. et al., 2004. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 53(3), pp.297–302.
- Tzoulaki, I. et al., 2007. Relative Value of Inflammatory, Hemostatic, and Rheological Factors for Incident Myocardial Infarction and Stroke: The Edinburgh Artery Study. *Circulation*, 115(16), pp.2119–2127.
- Umeno, A. et al., 2016. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. *Molecules*, 21(6), p.708.
- Uno, M., Kitazato, K.T., et al., 2005. Contribution of an imbalance between oxidant-antioxidant systems to plaque vulnerability in patients with carotid artery stenosis. *Journal of Neurosurgery*, 103(3), pp.518–25.
- Uno, M., Harada, M., et al., 2005. Elevation of plasma oxidized LDL in acute stroke patients is associated with ischemic lesions depicted by DWI and predictive of infarct enlargement. *Neurological Research*, 27(1), pp.94–102.
- Uno, M. et al., 2003. Raised plasma oxidised LDL in acute cerebral infarction. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(3), pp.312–6.
- Urbich, C. & Dimmeler, S., 2004. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation Research*, 95(4), pp.343–53.
- Uzun, H. et al., 2004. Oxidative stress in white coat hypertension; role of paraoxonase. *Journal of Human Hypertension*, 18(7), pp.523–8.
- Valensi, P. et al., 2016. Atherogenic dyslipidemia and risk of silent coronary artery disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovascular Diabetology*, 15(1), p.104.
- Valente, A.J. et al., 2014. OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radical Biology & Medicine*, 70, pp.117–28.
- Valls, R.-M. et al., 2015. Effects of functional olive oil enriched with its own phenolic compounds on endothelial function in hypertensive patients. A randomised controlled trial. *Food Chemistry*,

- 15(167), pp.30–5.
- Vanhoutte, P.M., 2009. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation Journal*, 73(4), pp.595–601.
- Vanhoutte, P.M., 1996. Endothelial dysfunction in hypertension. *Official Journal of the International Society of Hypertension*, 14(5), pp.S83-93.
- Varela-Moreiras, G. et al., 2013. The Spanish diet: an update. *Hospital Nutrition*, 28 Suppl 5, pp.13–20.
- Vasan, R.S. et al., 2001. Assessment of frequency of progression to hypertension in non- hypertensive participants in the Framingham Heart Study : a cohort study. *The Lancet*, 358(9294), pp.1682–1686.
- Vasconcelos, E.M.A. et al., 2009. Reactive oxygen species generation in peripheral blood monocytes and oxidized LDL are increased in hyperlipidemic patients. *Clinical Biochemistry*, 42(12), pp.1222–1227.
- Vassalle, C. et al., 2003. Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*, 14(3), pp.213–8.
- Vazquez, G. et al., 2007. Comparison of Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist/Hip Ratio in Predicting Incident Diabetes: A Meta-Analysis. *Epidemiologic Reviews*, 29(1), pp.115–128.
- Vázquez-Velasco, M. et al., 2011. Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *British Journal of Nutrition*, 105(10), pp.1448–1452.
- Vecchione, C. et al., 2002. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*, 51(1), pp.168–73.
- Veciana-Galindo, C. et al., 2015. Anti-adipogenic activity of an olive seed extract in mouse fibroblasts. *Hospital Nutrition*, 31(6), pp.2747–51.
- Vega, G.L. et al., 2006. Influence of Body Fat Content and Distribution on Variation in Metabolic Risk. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), pp.4459–4466.
- Verhoeven, V. et al., 2015. Can red yeast rice and olive extract improve lipid profile and cardiovascular risk in metabolic syndrome?: A double blind, placebo controlled randomized trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(52).
- Verma, S. et al., 2002. Endothelin Antagonism and Interleukin-6 Inhibition Attenuate the Proatherogenic Effects of C-Reactive Protein. *Circulation*, 105(16), pp.1890–1896.
- Verma, S., Buchanan, M.R. & Anderson, T.J., 2003. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation*, 108(2003), pp.2054–2059.
- Versari, D. et al., 2009. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 157(4), pp.527–536.
- Victor, V.M. et al., 2009. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), pp.2988–3002.
- Vilahur, G. et al., 2015. Polyphenol-enriched diet prevents coronary endothelial dysfunction by activating the Akt/eNOS pathway. *Spanish Journal of Cardiology*, 68(3), pp.216–25.
- Violante, B. et al., 2009. Effects of extra virgin olive oil supplementation at two different low doses

- on lipid profile in mild hypercholesterolemic subjects: A randomised clinical trial. *Journal of Endocrinological Investigation*, 32(10), pp.794–796.
- Violi, F. et al., 2015. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutrition & Diabetes*, 5(172).
- Virmani, R. et al., 1991. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *The American Journal of Pathology*, 139(5), pp.1119–29.
- Virmani, R. et al., 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular biology*, 20(5), pp.1262–75.
- Visioli, F. et al., 2000. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(3), pp.797–9.
- Vita, J.A., 2005. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(Suppl 1), p.292S–297S.
- Vongvatcharanon, U. et al., 2010. Influence of aging and long-term swimming exercise on parvalbumin distribution in rat hearts. *Acta Histochemica*, 112(1), pp.72–80.
- Van de Vrede, L. et al., 2013. An NO Donor Approach to Neuroprotective and Procognitive Estrogen Therapy Overcomes Loss of NO Synthase Function and Potentially Thrombotic Risk A. Cignarella, ed. *PLOS ONE*, 8(8), p.e70740.
- Wainstein, J. et al., 2012. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Journal of Medicinal Food*, 15(7), pp.605–10.
- Wallenfeldt, K. et al., 2004. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. *Journal of Internal Medicine*, 256(5), pp.413–20.
- Walter, D.H. et al., 2005. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circulation Research*, 97(11), pp.1142–51.
- Wang, J. et al., 2009. Disease-aging network reveals significant roles of aging genes in connecting genetic diseases. *PLoS Computational Biology*, 5(9), p.e1000521.
- Wang, J.C. & Bennett, M., 2012. Aging and Atherosclerosis. *Circulation Research*, 111(2).
- Wang, M. et al., 2007. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension*, 50(1).
- Wang, S. et al., 2013. Impact of baseline prehypertension on cardiovascular events and all-cause mortality in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *International Journal of Cardiology*, 168(5), pp.4857–60.
- Wang, X. et al., 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 349, p.g4490.
- Wang, Z.J. et al., 2015. Association of body mass index with mortality and cardiovascular events for patients with coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Heart*, 101(20),

- pp.1631–1638.
- Warner, J.H. et al., 2010. Adaptive regression modeling of biomarkers of potential harm in a population of U.S. adult cigarette smokers and nonsmokers. *BMC Medical Research Methodology*, 10(1), p.19.
- Warnholtz, A. et al., 2001. Antioxidants and endothelial dysfunction in hyperlipidemia. *Current Hypertension Reports*, 3(1), pp.53–60.
- Watts, G.F. et al., 2002. Coenzyme Q10 improves endothelial dysfunction of the brachial artery in Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 45(3), pp.420–426.
- Wegner, M. et al., 2012. Does oxidized LDL contribute to atherosclerotic plaque formation and microvascular complications in patients with type 1 diabetes? *Clinical Biochemistry*, 45(18), pp.1620–1623.
- Wegner, M. et al., 2010. The relationship between concentrations of magnesium and oxidized low density lipoprotein and the activity of platelet activating factor acetylhydrolase in the serum of patients with type 1 diabetes. *Magnesium Research*, 23(2), pp.97–104.
- Weigert, C. et al., 2006. Direct Cross-talk of Interleukin-6 and Insulin Signal Transduction via Insulin Receptor Substrate-1 in Skeletal Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), pp.7060–7067.
- Weinbreuner, T. et al., 2006. Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(1), pp.30–5–2.
- WHO, 2013. *A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland:
- WHO, 2011a. About cardiovascular diseases. The World Health Organization. Available at: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/ [Accessed March 21, 2017].
- WHO, 2001. *Ageing and Health. A health promotion approach for developing countries. The World Health Organization Regional Office for the Western Pacific*, Manila, Philippines.
- WHO, 2015a. Aging and Health. The World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/en/>.
- WHO, 2015b. *Cardiovascular Diseases. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2017a. Data and Statistics. The World Health Organization regional office for Europe. Available at: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/data-and-statistics> [Accessed January 11, 2017].
- WHO, 1999. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2016a. Diabetes. The World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> [Accessed February 22, 2017].
- WHO, 2003. *Diet, Nutrition and Chronic Disease Prevention. The World Health Organization Technical Reports Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2011b. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. The World Health*

- Organization Press in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2009. *Global Health Risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2011c. *Global status report on noncommunicable diseases 2010. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2014. *Global status report on noncommunicable diseases 2014. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland:
- WHO, 2017b. Hypertension. The World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/topics/hypertension/en/> [Accessed February 21, 2017].
- WHO, 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. *World Health Organization Technical Report Series*, 894(i-xii), pp.1-253.
- WHO, 2016b. Obesity and overweight. The World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> [Accessed February 24, 2017].
- WHO, 1995. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Technical Report Series No. 854 of World Health Organization*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2007. *Prevention of Cardiovascular Disease. Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2002. *Reducing Risks, Promoting Healthy Life. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2008. *The Global Burden of Disease: 2004 update. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2017c. What is the diabetes? The World Health Organization. Available at: http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index1.html [Accessed February 22, 2017].
- WHO, 2015c. *World Report on Ageing and Health. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2016c. *World Report on Diabetes Mellitus. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO/FAO, 2003. *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO/FAO, 1976. *Methodology of nutritional surveillance. Report of a Joint FAO/UNICEF/WHO Expert Committee. The World Health Organization Technical Report Series*, Geneva, Switzerland.
- WHO/FSA, 2010. *Creating an enabling environment for population-based salt reduction strategies. Report of a joint technical meeting held by World Health Organization (WHO) and the Food Standards Agency (FSA), United Kingdom. The World Health Organization Technical Report*, Geneva, Switzerland.
- WHO/ISH, 2003. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension

- (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension*, 21(11), pp.1983–92.
- WHO/ISH, 2007. *Prevention of cardiovascular disease: pocket guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. The World Health Organization Technical Report Series.*, Geneva, Switzerland.
- WHO/ISH, 2004. World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) hypertension guidelines. *Clinical and Experimental Hypertension*, 26(7–8), pp.747–52.
- Widmer, R.J. et al., 2013. Beneficial effects of polyphenol-rich olive oil in patients with early atherosclerosis. *European Journal of Nutrition*, 52(3), pp.1223–31.
- Willett, W.C. et al., 1993. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet (London, England)*, 341(8845), pp.581–5.
- Wilson, P.W.F. et al., 1998. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation*, 97(18).
- Winand, J. & Schneider, Y.-J., 2014. The anti-inflammatory effect of a pomegranate husk extract on inflamed adipocytes and macrophages cultivated independently, but not on the inflammatory vicious cycle between adipocytes and macrophages. *Food & Function*, 5(2), pp.310–318.
- Woodward, M. et al., 1999. Associations of blood rheology and interleukin-6 with cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *British Journal of Haematology*, 104(2), pp.246–57.
- Xu et al., 2014. Non-invasive endothelial function testing and the risk of adverse outcomes: a systematic review and meta-analysis. *European Heart Journal Cardiovascular Imaging*, 15(7), pp.736–46.
- Xu, S. et al., 2013. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(16), pp.2859–72.
- Xu, X. et al., 2014. Punicalagin inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPKs and NF- κ B activation. *Inflammation*, 37(3), pp.956–65.
- Xu, X.P. et al., 1999. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 99(8), pp.993–8.
- Yamashina, A. et al., 2003. Brachial-ankle pulse wave velocity as a marker of atherosclerotic vascular damage and cardiovascular risk. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 26(8), pp.615–22.
- Yamashita, H. et al., 2007. Elevated plasma levels of oxidized low-density lipoprotein relate to the presence of angiographically detected complex and thrombotic coronary artery lesion morphology in patients with unstable angina. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 71(5), pp.681–7.
- Yang, C. et al., 2014. The correlation between serum lipid profile with carotid intima-media thickness and plaque. *BMC Cardiovascular Disorders*, 14(1), p.181.
- Yang, Z. & Ming, X.-F., 2006. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clinical Medicine & Research*, 4(1), pp.53–65.
- Yeboah, J. et al., 2009. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular

- events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*, 120(6), pp.502–9.
- Yetik-Anacak, G. & Catravas, J.D., 2006. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 45(5), pp.268–76.
- Yeum, K.-J. et al., 2004. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), pp.97–103.
- Yin, H., 2008. New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. *BioFactors (Oxford, England)*, 34(2), pp.109–24.
- Yokota, T. & Hansson, G.K., 1995. Immunological mechanisms in atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 238(6), pp.479–89.
- Yui, S. et al., 1993. Induction of murine macrophage growth by modified LDLs. *Arteriosclerosis and Thrombosis: Journal of Vascular Biology*, 13(3), pp.331–7.
- Yurdagul, A. et al., 2014. $\alpha 5\beta 1$ integrin signaling mediates oxidized low-density lipoprotein-induced inflammation and early atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), pp.1362–73.
- Zakynthinos, E. & Pappa, N., 2009. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *Journal of Cardiology*, 53(3), pp.317–33.
- Zhai, H. et al., 2015. Inhibition of the NF- κ B pathway by R65 ribozyme gene via adeno-associated virus serotype 9 ameliorated oxidized LDL induced human umbilical vein endothelial cell injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), pp.9912–21.
- Zhang, C. et al., 2008. Abdominal Obesity and the Risk of All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality: Sixteen Years of Follow-Up in US Women. *Circulation*, 117(13), pp.1658–1667.
- Zhang, E. & Wu, Y., 2013. MicroRNAs: important modulators of oxLDL-mediated signaling in atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 20(3), pp.215–27.
- Zhang, H., Cui, J. & Zhang, C., 2010. Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis. *World Journal of Cardiology*, 2(11), pp.370–6.
- Zhang, X. et al., 2011. Cruciferous vegetable consumption is associated with a reduced risk of total and cardiovascular disease mortality. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), pp.240–246.
- Zhang, X. et al., 2004. Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: From bad to ugly en route to oxidative stress. *Alcohol*, 32(3), pp.175–186.
- Zhang, X., Cao, J. & Zhong, L., 2009. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(6), pp.581–586.
- Zieman, S. & Kass, D., 2004. Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congestive Heart Failure (Greenwich, Conn.)*, 10(3), pp.144–9–1.
- Zrelli, H. et al., 2013. Combined treatment of hydroxytyrosol with carbon monoxide-releasing molecule-2 prevents TNF α -induced vascular endothelial cell dysfunction through NO

- production with subsequent NFκB inactivation. *BioMed Research International*, 2013, p.912431.
- Zrelli, H., Matsuoka, M., Kitazaki, S., Araki, M., et al., 2011. Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: role of Nrf2 activation and HO-1 induction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), pp.4473–82.
- Zrelli, H., Matsuoka, M., Kitazaki, S., Zarrouk, M., et al., 2011. Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK-FOXO3a pathway. *European Journal of Pharmacology*, 660(2–3), pp.275–82.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.



CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO PARA INVESTIGACIÓN

Proyecto:
Promotora / IP:

Declaración del donante, representante legal o tutor

Yo, (nombre y apellidos) declaro que:

1. He leído La hoja de información y Consentimiento informado que me ha sido entregada
2. He preguntado y aclarado las posibles dudas sobre el estudio al Dr./Dra.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. Entiendo que mi participación en el estudio es voluntaria y comprendo que puedo solicitar la revocación de este consentimiento en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.
5. Autorizo el almacenamiento de mis muestras en el biobanco IdiPAZ SI ☐ NO ☐
6. Autorizo la comunicación de la información relevante derivada de la investigación, al igual que ser contactado en caso de necesitar más información SI ☐ NO ☐
7. Cuando el proyecto de investigación para el que estoy dando mi consentimiento informado se finalice quiero que el excedente de mis muestras almacenadas en el biobanco IdiPAZ:

- Se destruyan SI ☐ NO ☐

- Se sigan almacenando (de manera Anonimizada) en el biobanco para poder ser utilizadas en diversos proyectos de investigación que hayan pasado favorablemente la revisión de los comités ético y científico.
SI ☐ NO ☐

- Se sigan almacenando (de manera Codificada: disociada reversiblemente) en el biobanco para poder ser utilizadas en diversos proyectos de investigación que hayan pasado favorablemente la revisión de los comités ético y científico.

SI ☐ NO ☐

Fdo.:

Ena.....de.....de 20....

Declaración del profesional de la salud

Dña.....Colegiado Nº:

Fdo.:

Ena.....de.....de 20....

Anexo 2. REGISTRO DEL CONSUMO DE ALIMENTOS (3 DÍAS).

CUESTIONARIO DE REGISTRO DEL CONSUMO DE ALIMENTOS DE 3 DÍAS	
Nº DE PROTOCOLO:	INICIALES:
VISITA:	FECHA:
<p>INSTRUCCIONES:</p> <p>En el presente cuestionario se deben anotar todos los alimentos, bebidas, suplementos, dietéticos y preparados consumidos durante el plazo de tres días, uno de los cuales debe ser de fin de semana.</p> <p>Para cada día dispone de dos hojas, la primera para anotar los alimentos consumidos por la mañana y la segunda para anotar los alimentos tomados por la tarde. Se deben registrar todos los alimentos, bebidas y preparados, sin dividir aquellos que hayan sido tomados entre horas: cafés, cervezas, aperitivos, comprimidos, soluciones, golosinas.... No divida los vasos de agua o de otras bebidas tomadas en la comida o entre comidas.</p> <p>En la primera columna de cada hoja se deberán apuntar la hora de comienzo y finalización de la comida, el lugar (casa, cisterna, restaurante...) y el menú global, indicando el modo de cocinado de los alimentos (patatas fritas, filete a la plancha...).</p> <p>En la segunda columna se detallarán todos los ingredientes de cada una de las comidas del día, aportando el máximo número de datos que sea posible, sobre los alimentos consumidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Indique, en caso de tenerla la marca comercial. - Especifique si el alimento es normal, bajo en caloras o enriquecido. Por ejemplo si la leche es entera, desnatada o semidesnatada o el yogur entero, desnatado o enriquecido. - Tipo de queso: en porciones, manchego, roquefort.... - Tipo de aceite (oliva, girasol...). - Mantequilla o margarina. - Pan blanco, integral o de molde. <p>En la última de las columnas se debe indicar la cantidad de cada alimento que se ha tomado con la mayor precisión posible. Los mejores resultados se obtienen por pesada de cada uno de los productos consumidos, indicando si el alimento ha sido pesado en crudo o cocinado, y no olvide descontar o anotar como sobras los restos que deje sin consumir. En caso de que sea imposible proceder a pesar los alimentos, especifique la cantidad en medidas caseras: vasos, tazas, cucharadas..., por ejemplo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bebidas: las cantidades se pueden expresar en vasos, tazas, copas... de no disponer de medidas de volumen. - Sopas, caldos o purés: emplee tazas o platos (grande, mediano o pequeño). - Carnes, pescados, verduras, hortalizas y frutas: estime la cantidad consumida teniendo en cuenta la cantidad comprada y el número de piezas o porciones que entraron en la compra. De no tener estos datos indique número y tamaño de las porciones consumidas. - Legumbres: considere el tamaño del envase del que se parta y divídalo entre el número de raciones resultantes en el caso de que fueran todas iguales. O bien señale el tamaño aproximado de la ración indicando número de cucharadas o cazos servidos, tamaño del plato... - Aceite: indique el número y tipo de cucharadas (soperas, postre o café) añadidas a los guisos. En el caso de la fritura, reste las cucharadas que quedaron en la sartén, de las echadas al comenzar el proceso de fritura y reparta la cantidad resultante entre el número de piezas fritas, o entre el número de comensales, en el caso de que todas tomaran igual cantidad de alimentos. - Saltes o azúcar: apunte el número de cucharadas, su tamaño y si son rasas o colmadas. Para las salsas especifique si se tomaron o se dejaron, total o parcialmente, en el plato. - Pan: indique número de rebanadas o trozos y tamaño aproximado de las porciones consumidas. - Embutidos: anote el número de lonchas y su grosor. - En los alimentos precocinados, indique la marca y adjunte la composición, en caso de tenerla. - En el caso de preparados, suplementos o dietéticos indique el número de comprimidos, sobres, cucharadas... y la marca. De ser posible adjunte una fotocopia de la composición. 	

Desayuno 8.15-9.30 En casa	Leche con cereales Pan con mantequilla	1 vaso de leche semidesnatada (250 ml) 1 trozo de pan integral (1/4 de barra) 1 cucharilla de mantequilla
Media mañana 11.00-11.05 Colegio	1 manzana	1 unidad pequeña
Comida 13.30-14.00 Colegio	Gulantes con patatas Huevos fritos con plato Tarta de fresa	1 plato de postre 2 huevos 5 cucharadas de plato Un trozo de tarta (3 dedos de largo)
Merienda		
Cena En casa	Ensalada de lechuga con tomate aliñada con aceite y sal Berenjena rebozada Salmón con espárgagos a la plancha	2 hojas grande de lechuga ½ tomate 1 ½ cucharada de aceite 3 rodajas de berenjena Un filete mediano (120g) 2 unidades de espárgagos
Unidades de medidas de apoyo: Cucharadita de moka = 2,5 gramos Cucharadita de café = 5 gramos Cuchara de sopa = 10 gramos Cucharón de servir o cazo = 75 gramos Vaso normal = 200cc Vaso vino = 100 cc Vaso caña = 150 cc Taza = 250 cc Tazón, bol = 300 cc Taza café = 100 cc Plato hondo lleno = 225 cc Plato hondo medio lleno = 150 cc		

Cualquier duda o aclaración, puede anotarla en la parte posterior de las hojas del cuestionario

DÍA 1:		FECHA:
ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA MAÑANA		
DEBAYUNO	Alimentos (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
MEDIA MAÑANA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
COMIDA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		

DÍA 1:		FECHA:
ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA TARDE		
MERIENDA	Alimentos (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
CENA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
COMIDA ENTRE HORAS NO ESPECIFICADA ANTES		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		

DÍA 2:		FECHA:
ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA MAÑANA		
DEBAYUND	Alimentos (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
NEDIA MAÑANA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
COMIDA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		

DÍA 2.-		FECHA:
ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA TARDE		
MERIENDA	Alimentos (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
CENA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
COMIDA ENTRE HORAS NO ESPECIFICADA ANTES		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		

DÍA 8.-		FECHA:
ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA MAÑANA		
DEBAYUNO	Alimentos (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
MEDIA MAÑANA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
COMIDA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		

DÍA 2.-		FECHA:
ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA TARDE		
MERIENDA	Alimentos (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
CENA		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
COMIDA ENTRE HORAS NO ESPECIFICADA ANTES		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		
Hora de inicio: Hora de finalización: Lugar: Menú:		

Anexo 3. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS.

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS				
Nº DE PROTOCOLO:		INICIALES:		
VISITA:		FECHA:		
Señale la frecuencia con la que consume las raciones indicadas de cada uno de los grupos de alimentos prestando especial atención a los alimentos especificados, especificando cuantas veces los toma por día, semana o mes.				
ALIMENTOS	NUNCA	AL DÍA	A LA SEMANA	AL MES
Cereales:				
Pan (3 rodajas, 75 g)				
Pasta (60 g en crudo)				
Arroz (60 g en crudo)				
Patata (1 unidad, 150 g)				
Cereales desayuno (30 g)				
Galletas María (4-6 unidades)				
Otros				
Legumbres (1 plato)				
Frutas (1 pieza o ración)				
Granada (una)				
Aceituna (5 unidades)				
Manzana (una)				
Fresas/fresones (6 unidades, 1 plato postre)				
Naranja (una)				
Cerezas, picotas (1 plato de postre)				
Ciruelas (una)				
Uvas (un racimo (1 plato postre)				
Frambuesas (1 plato postre)				
Arándanos (1 plato postre)				
Moras (1 plato postre)				
Grosellas (1 plato postre)				
Verduras y hortalizas crudas (un plato o ración)				
Tomate crudo (uno)				
Cebolla (media unidad, 50 g)				
Acelgas, espinacas (150-200 g)				
Verduras y hortalizas cocinadas (un plato o ración)				
Tomate (150 g)				
Cebolla (media unidad, 50 g)				
Acelgas, espinacas (150-200 g)				
Brócoli (150-200 g)				

Alcachofas (150-200 g)				
Carnes (Un plato o ración de 100-150 gr)				
Peacados (Un plato o ración de 100-150 gr)				
Huevos (uno)				
Lácteos:				
Leche (un vaso)				
Otros lácteos (queso 40g, yogur 125g)				
Lípidos y aceites				
(Una cucharada sopera o porción individual)				
Aceite de oliva (una cucharada)				
Dulces (bollería 1, chocolate 30 g...)				
Chocolates y bombones (30 g)				
Cacao en polvo (1 cucharada de postre)				
Frutos secos				
Nueces (30 g)				
Almendras (30 g)				
Bebidas alcohólicas				
Vaso de vino rosado (100 cc)				
Vaso de vino tinto (100 cc)				
Vaso de vino blanco (100 cc)				
Cerveza (1 jarra/tercio, 330 cc)				
Bebidas no alcohólicas				
Zumo de naranja natural (1 vaso, 200 cc)				
Zumos naturales de otras frutas (1 vaso, 200 cc)				
Zumos de frutas en botella o enlatados (200 cc)				
Café descafeinado (1 taza, 50 cc)				
Café (1 taza, 50 cc)				
Té (1 taza, 50 cc)				
Agua				
Otros (Precocinados, Salsas, Snacks...)				

Anexo 4. LISTADO DE ALIMENTOS RICOS EN ANTIOXIDANTES.

Durante las 20 semanas que dura el estudio usted deberá mantener su dieta habitual pero deberá tener en cuenta no incrementar el consumo habitual de los siguientes alimentos		
	ALIMENTOS QUE NO DEBE CONSUMIR FUERA DE LO HABITUAL	ALIMENTOS RESTRINGIDOS
FRUTAS	Uvas Fresas Cerezas Ciruelas Frambuesas Arándanos Moras Grosellas Granada Aceitunas	
VERDURAS	Brócoli Tomates Espinacas Alcachofas	
FRUTOS SECOS	Nueces Almendras	
BEBIDAS	Té Vino tinto Zumo natural de naranja Zumos naturales de otras frutas Zumo de Tomate	Café. (máx. 2 taza al día) Cerveza (máx. 3 cañas/semana) Zumos de frutas en botella o enlatados (máx. 1/día) Vino tinto (máx. 2 copas/ día)
OTROS	Chocolate Cacao	Aceite oliva (máx. 4 cucharadas soperas)
Si consume alguno de los alimentos incluidos en esta tabla deberá ser anotado en la frecuencia de consumo de alimentos que le ha sido entregada a tal efecto.		

Anexo 5. CUESTIONARIO DIARIO DE REGISTRO DEL CONSUMO DEL PRODUCTO, MEDICAMENTOS/TRATAMIENTOS CONCOMITANTES Y POSIBLES ACONTECIMIENTOS ADVERSOS.

CUESTIONARIO DE DIARIO DE REGISTRO DEL CONSUMO DEL PRODUCTO, MEDICAMENTOS/TRATAMIENTOS CONCOMITANTES Y POSIBLES ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Instrucciones para cumplimentar el cuestionario:

- Anote el nº de cápsulas del producto en estudio (0, 1, 2...) que toma en cada momento durante esta semana.
- Especifique si ha tomado algún medicamento o tratamiento concomitante durante este periodo y el nº de cápsulas.

Semana 1 comprendida entre el día __/__/__ y el día __/__/__

	PRODUCTO DEL ESTUDIO		OTROS MEDICAMENTOS/ TRATAMIENTOS CONCOMITANTES	POSIBLES ACONTECIMIENTOS ADVERSOS
DÍA 1	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 2	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 3	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 4	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 5	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 6	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 7	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			

Semana 2 comprendida entre el día ____/____/____ y el día ____/____/____

	PRODUCTO DEL ESTUDIO		OTROS MEDICAMENTOS/ TRATAMIENTOS CONCOMITANTES	POSIBLES ACONTECIMIENTOS ADVERSOS
DÍA 1	1º TOMA			
	2º TOMA			
	3º TOMA			
DÍA 2	1º TOMA			
	2º TOMA			
	3º TOMA			
DÍA 3	1º TOMA			
	2º TOMA			
	3º TOMA			
DÍA 4	1º TOMA			
	2º TOMA			
	3º TOMA			
DÍA 5	1º TOMA			
	2º TOMA			
	3º TOMA			
DÍA 6	1º TOMA			
	2º TOMA			
	3º TOMA			
DÍA 7	1º TOMA			
	2º TOMA			
	3º TOMA			

Semana 3 comprendida entre el día __/__/__ y el día __/__/__

	PRODUCTO DEL ESTUDIO		OTROS MEDICAMENTOS/ TRATAMIENTOS CONCOMITANTES	POSIBLES ACONTECIMIENTOS ADVERSOS
DÍA 1	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 2	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 3	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 4	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 5	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 6	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			
DÍA 7	1ª TOMA			
	2ª TOMA			
	3ª TOMA			

Semana 4 comprendida entre el día ____/____/____ y el día ____/____/____

	PRODUCTO DEL ESTUDIO		OTROS MEDICAMENTOS/ TRATAMIENTOS CONCOMITANTES	POSIBLES ACONTECIMIENTOS ADVERSOS
DÍA 1	1º IOMA			
	2º IOMA			
	3º IOMA			
DÍA 2	1º IOMA			
	2º IOMA			
	3º IOMA			
DÍA 3	1º IOMA			
	2º IOMA			
	3º IOMA			
DÍA 4	1º IOMA			
	2º IOMA			
	3º IOMA			
DÍA 5	1º IOMA			
	2º IOMA			
	3º IOMA			
DÍA 6	1º IOMA			
	2º IOMA			
	3º IOMA			
DÍA 7	1º IOMA			
	2º IOMA			
	3º IOMA			

Anexo 7. REGISTRO DEL NÚMERO DE CIGARRILLOS FUMADOS EN LOS 10 DÍAS PREVIOS A LA SIGUIENTE VISITA.

CUESTIONARIO DE REGISTRO DEL NÚMERO DE CIGARRILLOS FUMADOS 10 DÍAS PREVIOS A LA PRÓXIMA VISITA
<p><u>Instrucciones para cumplimentar el cuestionario:</u></p> <p>- Anote el nº de cigarrillos fumados en los 10 días previos a la próxima consulta en los periodos de la mañana, tarde y noche.</p>

Días previos a la última visita, comprendidos entre los días ____/____/____ y ____/____/____
--

DÍAS PREVIOS A LA PRÓXIMA VISITA	NÚMERO DE CIGARRILLOS FUMADOS
10 DÍAS PREVIOS	
9 DÍAS PREVIOS	
8 DÍAS PREVIOS	
7 DÍAS PREVIOS	
6 DÍAS PREVIOS	
5 DÍAS PREVIOS	
4 DÍAS PREVIOS	
3 DÍAS PREVIOS	
2 DÍAS PREVIOS	
1 DÍA PREVIO	
TOTAL (PARA SER RELLENADO POR EL INVESTIGADOR)	

Anexo 8. REGISTRO DE CONSUMO DEL PRODUCTO (DIARIO).

REGISTRO DE CONSUMO DEL PRODUCTO (DIARIO)
Unidad de Nutrición Clínica y Dietética – Hospital Universitario "La Paz", Madrid

INICIALES:

FECHA:

[illegible]

Anexo 9. CUESTIONARIO DE TOLERANCIA AL TRATAMIENTO DEL ESTUDIO.

CUESTIONARIO DE TOLERANCIA AL TRATAMIENTO	
Nº DE PROTOCOLO:	INICIALES:
VISITA:	FECHA:
<i>Tolerancia</i>	<i>Cambios en la alimentación</i>
Nauseas	Como más
Acidez	Como igual
Diarrea	Como menos
Estreñimiento	
Vientre hinchado	
Mal aliento	

Anexo 10. REGISTRO DE DISTRIBUCIÓN/DEVOLUCIÓN DEL PRODUCTO DEL INVESTIGADOR.

REGISTRO DE DISTRIBUCIÓN/DEVOLUCIÓN DEL PRODUCTO					
	Fecha de la Visita	Cantidad de producto entregado al sujeto (especificar cantidad de capsulas)	Cantidad de producto devuelto por el sujeto (especificar cantidad de capsulas sobrantes y, si no sobra ninguno indicar "0")	Nombre y apellido de la persona que entrega/recibe el producto	Comentarios
VISITA 1 (SEMANA 1 - Día 1)	____/____/____ dd / mm / aa		-----		
VISITA 2 (SEMANA 5 - Día 28 ± 2)	____/____/____ dd / mm / aa				
VISITA 3 (SEMANA 9 - Día 56 ± 2)	____/____/____ dd / mm / aa	-----			
VISITA 4 (SEMANA 13 - Día 84 ± 2)	____/____/____ dd / mm / aa		-----		
VISITA 5 (SEMANA 17 - Día 112 ± 2)	____/____/____ dd / mm / aa				
VISITA 6 (SEMANA 21 - Día 140 ± 2)	____/____/____ dd / mm / aa	-----			

